



INSTITUTO DE RECURSOS
NATURALES Y AGROBIOLOGIA
DE SEVILLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE CRISTALOGRAFIA,
MINERALOGIA Y QUIMICA AGRICOLA

TESIS DOCTORAL

CARLOS LUIS CARRETERO MONTERO

**TOLERANCIA A LA SALINIDAD DE PLANTAS DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Cranz): INFLUENCIA DE LA MICORRIZA.**

**TOLERANCIA A LA SALINIDAD DE PLANTAS DE MANDIOCA
(*Manihot esculenta* Cranz): INFLUENCIA DE LA MICORRIZA.**

Memoria presentada por el licenciado D. Carlos Luis Carretero Montero
para optar al grado de Doctor en Biología.

Sevilla, Octubre de 2002

DIRECTORES

DR. ANTONIO TRONCOSO DE ARCE
Profesor de Investigación del CSIC

DR. MANUEL CANTOS BARRAGAN
Titulado Superior del CSIC

TUTORA
Dra. CELIA ESPINO GONZALO

ANTONIO TRONCOSO DE ARCE y MANUEL CANTOS BARRAGAN, como Directores de la Tesis Doctoral presentada por Carlos Luis Carretero Montero y titulada “Tolerancia a la salinidad de plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Cranz): influencia de la micorriza”, para aspirar al Grado de Doctor,

INFORMAN: que la citada Tesis Doctoral se ha realizado utilizando la metodología adecuada y haciendo uso de las técnicas idóneas para cumplir los objetivos previstos.

Y para que conste a los efectos de tramitación para la obtención del citado Grado de Doctor, se firma el presente informe.

Sevilla, Octubre de 2002

Fdo. A. Troncoso de Arce

Fdo. M. Cantos Barragán

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido realizado en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC), por lo que agradezco en primer lugar a la Dirección del Instituto y a todo su personal, y en especial a D. Jesús Prieto por su confianza.

En segundo lugar a los doctores D Antonio Troncoso de Arce y D. Manuel Cantos Barragán, directores de este trabajo por el tiempo que me han dedicado, colaboración y enorme paciencia demostrada durante su desarrollo.

A los doctores D. José Aijón Noguera y D. Juan Manuel Lara Pradas y a Maite Sánchez, del Dep. de Biología Celular de la Universidad de Salamanca por su valiosa e inestimable colaboración en el estudio histológico llevado a cabo en este trabajo.

A la Dra. Carmen Mazuelos así como a Carmen Grande y Asunción Castro por su colaboración en la realización de los análisis químicos llevados a acabo en este trabajo.

A las Dras. Rosario Azcón y Concepción Azcón, de la Estación Experimental del Zaidín de Granada (CSIC) por su inestimable ayuda en los aspectos bibliográficos así como por sus críticas y consejos en todo lo relacionado con las micorrizas.

A Juana Liñán, Beatriz Cubero, Carmen Villalón, Jose Luis García, Rafael Zárate, Rafael Sarmiento y a todos los compañeros del departamento por su amistad y colaboración.

Muy especialmente a Isa, Rafa e Isabel por haberme animado y aguantado durante la realización de este trabajo y por el tiempo que no les pude dedicar.

A mi familia

INDICE

	Pag.
INDICE DE FIGURAS.....	I
INDICE DE TABLAS.....	IV
ABREVIATURAS EMPLEADAS.....	VIII
I. ANTECEDENTES	4
II. INTRODUCCIÓN GENERAL	5
III. OBJETIVOS.....	25
IV. PROPAGACIÓN IN VITRO	
IV.1. INTRODUCCIÓN.....	26
IV.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
IV.3.1. Influencia de la presencia de auxina (ANA) en el medio sobre la radicación y el desarrollo del explanto de mandioca in vitro.....	31
IV.3.1.1. <u>Tanto por ciento de radicación</u>	31
IV.3.1.2. <u>Número de raíces por planta</u>	31
IV.3.1.3. <u>Longitud media de raíces</u>	32
IV.3.1.4. <u>Longitud del tallo</u>	32
IV.3.1.5. <u>Número de yemas</u>	32
IV.3.2. Influencia de la citoquinina en el desarrollo in vitro del explanto de mandioca.....	33
IV.3.3. Prueba de adaptación a condiciones "in vivo".....	35
V. INFLUENCIA DE LA SALINIDAD (NaCl) EN EL DESARROLLO DE PLANTAS DE MANDIOCA (<i>Manihot esculenta</i> Cranz) IN VITRO.	
V.1. INTRODUCCIÓN.....	38
V.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
V.2.1. Determinaciones analíticas.....	42
V.3. RESULTADOS.....	44
V.3.1. Influencia de la salinidad sobre la supervivencia del explanto.....	44
V.3.2. Desarrollo de los explantos supervivientes.....	46
V.3.3. Influencia de la concentración de NaCl sobre el contenido de nutrientes en plantas de mandioca cultivadas in vitro.....	54
V.3.3.1. <u>Nitrógeno</u>	54

V.3.3.2.	<u>Fósforo</u>	56
V.3.3.3.	<u>Potasio</u>	56
V.3.3.4.	<u>Calcio</u>	59
V.3.3.5.	<u>Magnesio</u>	59
V.3.3.6.	<u>Sodio</u>	59
V.3.3.7.	<u>Cloro</u>	61
V.3.3.8.	<u>Cobre</u>	61
V.3.3.9.	<u>Hierro</u>	61
V.3.3.10.	<u>Manganeso</u>	61
V.3.3.11.	<u>Cinc</u>	63
V.4.	DISCUSIÓN	63
VI.	TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN CONDICIONES DE INVERNADERO.	
VI.1.	INTRODUCCIÓN	65
VI.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	67
VI.3.	RESULTADOS	69
VI.3.1.	Efectos sobre el sustrato	69
VI.3.1.1.	<u>Características de las soluciones nutritivas empleadas en los tratamientos.</u>	69
VI.3.1.2.	<u>Influencia de los tratamientos salinos sobre el sustrato</u>	70
VI.3.2.	Tolerancia de las plantas de mandioca a la salinidad del medio	72
VI.3.2.1.	<u>Supervivencia</u>	72
VI.3.2.2.	<u>Desarrollo de plantas supervivientes</u>	75
VI.3.2.3.	<u>Producción relativa</u>	79
VI.3.2.4.	<u>Influencia de la concentración de NaCl sobre el contenido de nutrientes en plantas de mandioca cultivadas ex vitro</u>	81
VI.3.2.4.1.	<u>Nitrógeno</u>	81
VI.3.2.4.2.	<u>Fósforo</u>	81
VI.3.2.4.3.	<u>Potasio</u>	81
VI.3.2.4.4.	<u>Calcio</u>	81
VI.3.2.4.5.	<u>Magnesio</u>	84

VI.3.2.4.6. <u>Sodio</u>	84
VI.3.2.4.7. <u>Cloro</u>	84
VI.3.2.4.8. <u>Micronutrientes</u>	84
VI.4. DISCUSIÓN.....	88
VII. EFECTO DE LA MICORRIZA	
VII.1. INTRODUCCIÓN.....	90
VII.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	91
VII.3. RESULTADOS.....	93
VII.3.1. Efecto de la micorriza en la adaptación y aclimatación de los tres clones de mandioca.....	93
VII.3.2. Influencia de la micorriza <i>Glomus fasciculatum</i> sobre la supervivencia de plantas de mandioca sometidas a tratamientos salinos.....	95
VII.3.3. Influencia de la micorriza <i>Glomus fasciculatum</i> sobre el desarrollo de plantas de mandioca sometidas a tratamientos salinos.....	97
VII.4 DISCUSIÓN.....	99
VIII. DESARROLLO IN VITRO Y EX VITRO DE EXPLANTOS-PLANTAS DEL CLON SOM-1 DE MANDIOCA, PROCEDENTES DE PLANTAS MICORRIZADAS Y NO MICORRIZADAS.	
VIII.1. INTRODUCCIÓN.....	107
VIII.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	108
VIII.3. RESULTADOS.....	112
VIII.4. DISCUSIÓN.....	126
IX. DISCUSIÓN GENERAL.....	130
X.CONCLUSIONES.....	135
XI. BIBLIOGRAFIA.....	137

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
fig. 1. Distribución mundial de los suelos afectados por sales	6
fig. 2. Clasificación de las Glomales	11
fig. 3. Planta de mandioca con tubérculos.....	15
fig. 4. Tendencia de la producción de mandioca en el mundo.....	17
fig. 5. Distribución geográfica de la mandioca en el mundo.....	17
fig. 6. Biomasa relativa (% control) en peso fresco y seco de plantas de mandioca tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado	51
fig 7. Ajuste de la biomasa relativa del peso fresco y seco mediante funciones exponenciales.....	51
fig. 8. Longitud media del tallo tras 60 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	52
fig. 9. Número de raíces desarrolladas tras 60 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	52
fig. 10. Número de yemas desarrolladas tras 60 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	52
fig. 11. Número de hojas desarrolladas tras 60 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	53
fig. 12. Temperaturas máximas, mínimas y medias registradas en el invernadero durante el desarrollo de la prueba.....	73
fig 13. Longitud del tallo, número de hojas y número de yemas observadas en las plantas durante el desarrollo de la prueba.....	79
fig 14. Peso fresco relativo en % tomando como referencia el obtenido en el tratamiento control en plantas de los clones SOM, 05 y 50 (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 gl ⁻¹	80
fig 15. Peso seco relativo en % tomando como referencia el obtenido en el tratamiento control en plantas de los clones SOM, 05 y 50 (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 gl ⁻¹	80

- fig. 16. Raíz de mandioca sin micorriza (a) (x40) y micorriza (b) con *Glomus fasciculatum* (x100).....104
- fig 17. Esquema general de los ensayos desarrollados en el capítulo VIII. La letra “A” se aplica a plantas de mandioca que no han estado en contacto con *Glomus deserticola* (II Ag 8903); la letra “B” se aplica a plantas de mandioca que han estado en contacto con *Glomus deserticola* (II Ag 8903) G.f. indica una micorrización con *Glomus fasciculatum*.....111
- fig. 18. Plantas del clon SOM-1 procedentes de cultivo in vitro, no micorrizadas (A) y micorrizadas con *Glomus deserticola* (II Ag 8903) (B) creciendo en invernadero durante 30 días.....112
- fig. 19. Raíces de mandioca no micorrizada a (100x) y micorrizada con *Glomus deserticola* (II Ag 8903) b(100x), c (100x), d (200x) e(100x) y f (100x). En a no se observan estructuras teñidas con azul trypan, mientras que en el resto se observan esporas e hifas características de MVA.....113
- fig. 20. Desarrollo in vitro de plántulas de mandioca procedentes de plantas no micorrizadas “A” y procedentes de plantas micorrizadas con *G. deserticola* (II Ag 8903) en medio MS sin reguladores de crecimiento.....114
- fig. 21. Plantas de los tipos “A” (no micorrizada previamente) y “B” (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca, e inoculadas, creciendo durante 80 días en suelo sin micorrizar (A y B) y micorrizado con *Glomus fasciculatum* (A + G.f. y B+G.f.).....116
- fig. 22. Imágenes obtenidas en el microscopio de raíces de plantas A (no micorrizada y de origen no micorrizado), A+G.f. (micorrizada y de origen no micorrizado) donde se observan estructuras fúngicas características, B (no micorrizada y de origen micorrizado) donde se aprecian estructuras fúngicas y B+G.f. (micorrizada y de origen micorrizado) teñidas con azul trypan (100x) en donde junto con las esporas propias de esta micorriza se observa una mayor cantidad de hifas.....120
- fig. 23. Plantas de los tipos A (no micorrizada previamente) y B (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca creciendo en cámara de cultivo durante 56 días.....122
- fig. 24. Plantas de los tipos A (no micorrizada previamente) y B (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca creciendo en cámara de cultivo durante 70 días.....122
- fig.25. Imágenes obtenidas en el microscopio de raíces de plantas A (no micorrizada previamente) (a) 40x y B (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) (b) 40x, (c) 100x, (d) 100x, (e) 100x y (f) 400x, teñidas con azul trypan (100x) donde se pueden apreciar hifas y estructuras globosas que presentan afinidad por este colorante.....123

- fig. 26. Secciones transversales de raíz, tallo y hoja de planta de tipo A (no micorrizadas previamente (a, b y c respectivamente) y de tipo B (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903» (d, e y f respectivamente), procedentes de cultivo in vitro y teñidas con fucsina verde luz (200x). En la imagen d se aprecian oquedades inmersas en el parénquima que no se aprecian en la imagen a. Con respecto al tallo, en la imagen e se observan también unas estructuras próximas a la exodermis que no aparecen en la imagen b. Por último, en la imagen f se puede observar una organización la hoja ligeramente distinta a la observada en la imagen c.....124
- fig. 27. Secciones transversales de raíz, tallo y hoja de planta de tipo A (no micorrizadas previamente (a, b y c respectivamente) y de tipo B (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903» (d, e y f respectivamente), procedentes de cultivo ex vitro y teñidas con fucsina verde luz (200x). La imagen d corresponde a una de las con inicio de tuberización. Con respecto al tallo, en la imagen e se vuelven a observar unas estructuras próximas a la exodermis que no aparecen en la imagen b. Por último, en la imagen f se puede observar una mayor que organización la imagen c.....125
- fig. 28. Secciones longitudinales de raíces in vitro (a, b, c y d) y ex vitro (e, f, g y h) de plantas A y B empleando tinción fucsina-verde luz y azul trypan (100x).....127
- fig. 29. Secciones longitudinales de tallos in vitro (a, b, c y d) y ex vitro (e, f, g y h) de plantas A y B empleando tinción fucsina-verde luz y azul trypan (100x).....128

INDICE DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Longitud y número medio de raíces y longitud y número medio de yemas del tallo de plantas de mandioca desarrolladas en presencia y ausencia de ANA en el medio de cultivo.....	33
Tabla 2. Influencia de BA y kinetina sobre el desarrollo del explanto de mandioca tras 35 días de cultivo "in vitro" (media de los 3 clones).....	34
Tabla 3. Evolución del tanto por ciento de plantas supervivientes al trasplante en la fase de adaptación.....	35
Tabla 4. Longitud media y número medio de brotes de plantas de mandioca adaptadas a condiciones "ex vivo" en relación al tipo de raíz.....	36
Tabla 5. Efecto de la salinidad sobre la supervivencia de explantos de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50 después de 80 días de cultivo in vitro (primer ensayo).....	45
Tabla 6. Efecto de la salinidad sobre la supervivencia de explantos de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50 después de 80 días de cultivo in vitro (segundo ensayo).....	46
Tabla 7. Valores medios de biomasa (peso fresco) de raíz, tallo hojas y planta completa en mg de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50 creciendo in vitro durante 80 días en medio salinizado con NaCl.....	47
Tabla 8. Valores medios de biomasa (peso seco) de raíz, tallo, hojas y planta completa en mg de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50 creciendo in vitro durante 80 días en medio salinizado con NaCl.....	48
Tabla 9. Efecto de la salinidad en el porcentaje de hidratación de raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50 creciendo in vitro durante 80 días en medio salinizado con NaCl.....	49
Tabla 10. Longitud, número de hojas y superficie foliar a los 80 días de cultivo de cada clon, en los diferentes medios salinizados con NaCl.....	53
Tabla 11. Concentración de nitrógeno y fósforo (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	55
Tabla 12. Concentración de potasio y calcio (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	57

Tabla 13. Concentración de magnesio y sodio (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	58
Tabla 14. Concentración de cloro (%) y cobre (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	60
Tabla 15. Concentración de hierro y manganeso (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	62
Tabla 16. Concentración de cinc (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.....	63
Tabla 17. Composición de las distintas soluciones empleadas para riego.....	69
Tabla 18. Características físicas y químicas del sustrato.....	71
Tabla 19. Influencia de los tratamientos sobre la salinización del sustrato.....	72
Tabla 20. Número de plantas vivas registradas en cada una de las etapas del proceso desde el trasplante a suelo hasta la finalización del proceso de salinización.....	73
Tabla 21. Plantas vivas registradas a los 0, 30, 35, 40, 45 y 50 días después de alcanzado el nivel de sal en el agua de riego fijado para el ensayo.....	74
Tabla 22. Influencia de la salinidad sobre el peso fresco de raíz, tallo, hojas y planta completa en los tres clones de mandioca (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 g l ⁻¹).....	75
Tabla 23. Influencia de la salinidad sobre el peso seco de raíz, tallo, hojas y planta completa en los tres clones de mandioca (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 g l ⁻¹).....	76
Tabla 24. Influencia de la salinidad sobre el grado de hidratación de raíz, tallo, hojas y planta completa en los tres clones de mandioca (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 g l ⁻¹).....	77
Tabla 25. Longitud, número de hojas y superficie foliar en los tres clones de mandioca planta completa en los tres clones de mandioca (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 g l ⁻¹).....	78

Tabla 26. Concentración de nitrógeno y fósforo (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 g l ⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).....	82
Tabla 27. Concentración de potasio y calcio (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 g l ⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).....	83
Tabla 28. Concentración de magnesio y sodio (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 g l ⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).....	85
Tabla 29. Concentración de cloro (%) y cobre (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 g l ⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).....	86
Tabla 30. Concentración de hierro y manganeso (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 g l ⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).....	87
Tabla 31. Concentración de cinc (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 g l ⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).....	88
Tabla 32. Efecto de la micorriza sobre el peso fresco, seco e hidratación de raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones de mandioca creciendo en invernadero durante seis semanas.....	94
Tabla 33. Longitud del tallo, número de hojas, número de yemas y diámetro inferior del tallo de plantas de los tres clones de mandioca creciendo en invernadero durante seis semanas.....	95
Tabla 34. Número de plantas micorrizadas vivas registradas en cada una de las etapas del proceso del trasplante in vitro-ex vitro.....	96

Tabla 35. Plantas micorrizadas y no micorrizadas vivas a los 30, 35, 40, 45 y 50 días después de haber iniciado el ensayo de salinización.....	96
Tabla 36. Efecto de la micorriza en el peso fresco, seco e hidratación de raíz, tallo, hoja y planta completa de los tres clones de mandioca creciendo en invernadero.....	98
Tabla 37. Composición mineral de la raíz en plantas de mandioca micorrizadas y no micorrizadas de cada clon creciendo en tres concentraciones salinas tras 50 días de cultivo en invernadero.....	100
Tabla 38. Composición mineral del tallo en plantas de mandioca micorrizadas y no micorrizadas de cada clon creciendo en tres concentraciones salinas tras 50 días de cultivo en invernadero.....	101
Tabla 39. Composición mineral de hojas en plantas de mandioca micorrizadas y no micorrizadas de cada clon creciendo en tres concentraciones salinas tras 50 días de cultivo en invernadero.....	102
Tabla 40. Composición mineral de plantas de mandioca micorrizadas y no micorrizadas de cada clon creciendo en tres concentraciones salinas tras 50 días de cultivo en invernadero.....	103
Tabla 41. Biomasa expresada como peso fresco, peso seco e hidratación de plantas de los tipos “A” (no micorrizadas previamente) y “B” (micorrizadas previamente con <i>G. deserticola</i> (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca tras 56 días de cultivo in vitro.....	115
Tabla 42. Estado nutritivo de la raíz, tallo, hojas y planta completa de los tipos “A” (no micorrizadas previamente) y “B” (micorrizadas previamente con <i>G. deserticola</i> (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca tras 56 días de cultivo in vitro.....	115
Tabla 43. Peso fresco, peso seco y grado de hidratación de plantas del tipo "A" (no micorrizadas previamente) y "B" (micorrizadas previamente con <i>G. deserticola</i> (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca, creciendo en invernadero durante 80 días en suelo no micorrizado (sin G.f) y micorrizado con <i>Glomus fasciculatum</i> (con G.f).....	117
Tabla 44. Estado nutritivo de raíz, tallo, hoja y planta de los tipos "A" (no micorrizadas previamente) y "B" (micorrizadas previamente con <i>G. deserticola</i> (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca, creciendo en invernadero durante 80 días, no micorrizadas (sin G.E) y micorrizadas con <i>Glomus fasciculatum</i> (con G.f).....	118

ABREVIATURAS EMPLEADAS

EPS	= exchangeable sodium percentage
SAR	= sodium adsorption ratio
MVA	= micorriza vesículo arbuscular
cm	= centímetro
°C	= grados Celsius
atm	= atmósfera
μ	= micra
l	= litro
ANA	= Acido α-Naphtalen acético
BA	= 6- benzilaminopurina
GA	= ácido giberélico
μM	= microMolar
GA ₃	= ácido giberélico
mg l ⁻¹	= miligramo por litro
2iP	= 6-(γ,γ-dimethylallylamino) purina
TDZ	= (N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea)
M	= Molar
2,4-D	= ácido 2,4- diclorofenoxiacético
AAB	= ácido abcísico
g l ⁻¹	= gramos por litro
ml	= mililitro
μE m ⁻² s ⁻¹	= micro Einstein por metro cuadrado segundo
w	= vatio
L.S.D	= mínima diferencia significativa
MS	= medio de Murashige y Skoog.
mm	= milímetro
dS m ⁻¹	= deciSiemens por metro
nm	= nanómetro
χ ²	= Chi cuadrado
ppm	= partes por millón
CE	= Conductividad Eléctrica.
g	= gramo
U.S.S.L.	= United States Salinity Laboratory
cm ³	= centímetro cúbico
Kg ⁻¹	= kilogramo
X	= aumento en microscopía
h	= hora
G.f.	= Glomus fasciculatum
Ø	= diámetro
min	= minuto
s	= segundo
C ₅₀	= Concentración 50%

I. ANTECEDENTES

El presente estudio tiene su origen en el proyecto titulado “Amélioration des cultivars africains de manioc” financiado por la CEE con el número de contrato TS2A-0239-M (CD). Este proyecto estuvo coordinado por Joseph Mabanza del Laboratoire d’Amélioration des plantes et de Culture in vitro (LAP-CV)/DGRST de Congo Brazzaville.

En el proyecto participaron las siguientes instituciones:

Gabón : Projet-FAO-CIAM

Francia: ORSTON Génétique Montpellier. Université Paris Sud (Laboratoire de Morphogénèse Végétale Expérimentale).

Italia: Istituto sulla Propagazione delle Specie Legnose di Firenze (CNR).

España:

- Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (CSIC).
- Estación Experimental del Zaidín de Granada (CSIC).

II. INTRODUCCIÓN GENERAL

La necesidad de producir mayor cantidad de alimentos y de manera más constante, obliga a pensar en la utilización de tierras marginales que se caracterizan, a veces, por presentar suelos y aguas con alto grado de salinidad.

La salinidad en el suelo o en el agua representa una de las situaciones de estrés para las plantas, cuya importancia en la agricultura va en aumento. Por ello, resulta muy interesante disponer de plantas cultivadas tolerantes a la salinidad y así mantener su potencial productivo.

En general, un suelo salino se forma cuando la entrada de sales es mayor que su salida, lo que depende del clima, geomorfología, relieve e hidrología (Ponnamperuma, 1984).

El exceso de sales en un suelo puede obedecer a la presencia de rocas salinas, como ocurre en las regiones semiáridas y áridas del mundo (Greenway y Munns, 1980; Tanji, 1990), o como se produce en áreas costeras tanto áridas como húmedas, por la intrusión en superficie o en el subsuelo del agua del mar. Otra fuente de salinización puede ser el propio riego. A este proceso se le denomina salinización secundaria y se produce al regar con agua salina en condiciones de drenaje deficiente. Un tercio de los regadíos en el mundo se ven afectados por sales. En general, las hectáreas afectadas por la salinidad en el mundo (fig. 1) se estiman en mil millones (Dudal y Purnell, 1986).

El principal efecto de la salinidad sobre los cultivos es el descenso de su rendimiento y calidad, que se traduce en pérdidas económicas a la vez que convierte las tierras en improductivas, con su consiguiente abandono y posterior desertización (Royo y Aragües, 1989).

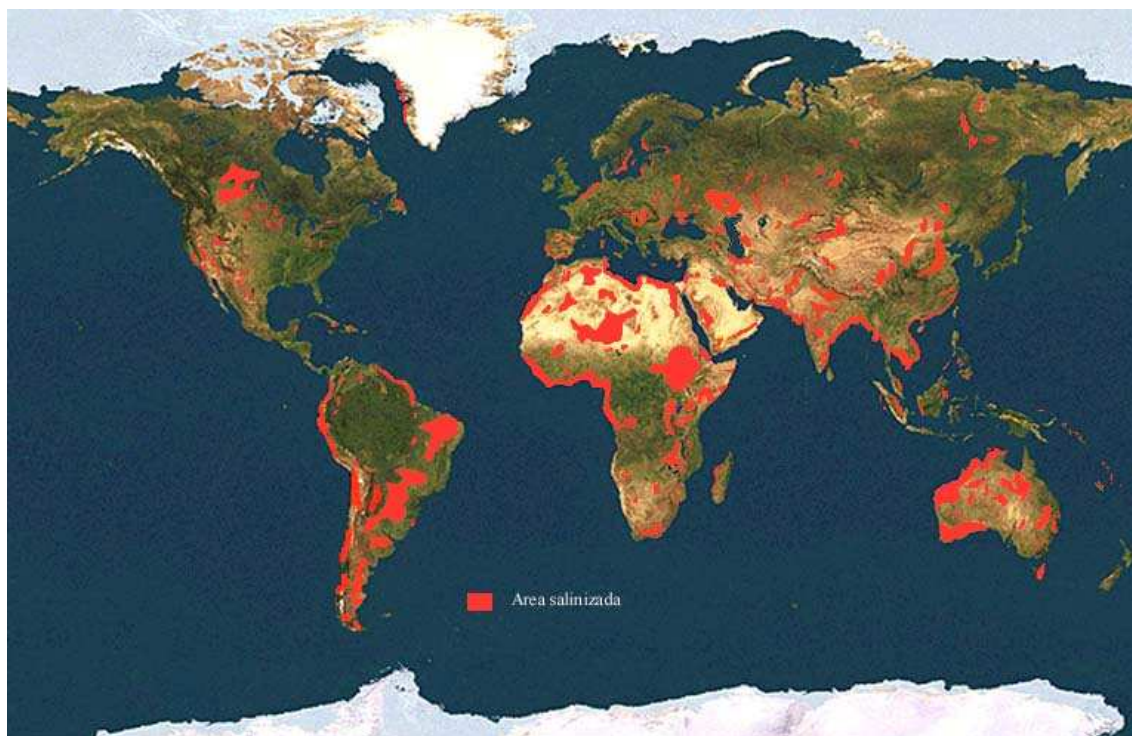
Las acciones de la salinidad ejerce sobre las plantas pueden ser estudiadas desde tres aspectos fundamentales (Pasternak, 1987):

- Acciones sobre las relaciones energéticas
- Acciones sobre las relaciones hídricas.
- Acciones sobre las relaciones nutricionales.

La adaptación de las plantas a la salinidad puede dar origen a una disminución de las reservas energéticas necesarias para el crecimiento. Estas pérdidas energéticas pueden deberse a la desviación de los fotosintatos necesarios para el crecimiento hacia

funciones osmorreguladoras o a la energía consumida en el transporte iónico (Pasternak, 1987).

fig. 1. Distribución mundial de los suelos afectados por sales (según Szabolcs 1985).



El incremento de la salinidad en el terreno provoca un descenso del potencial hídrico de la solución del suelo. Este descenso puede inducir una reducción de potencial hídrico en la hoja, que a su vez origina una reducción de la turgencia y expansión celular y por tanto una disminución del crecimiento de la planta. Esta disminución del crecimiento puede minimizarse total o parcialmente por medio del denominado ajuste osmótico (Gale et al., 1967; Termaat et al., 1985) que permite compensar en mayor o menor medida la reducción del potencial osmótico de la solución del suelo. Tras este periodo de ajuste osmótico, la turgencia y expansión celular pueden retornar a valores iniciales siempre que las propiedades de transmisión de agua en la planta no hayan sido afectadas.

Las acciones que la salinidad del medio ejerce sobre las relaciones nutricionales en las plantas, vienen determinadas por dos aspectos relacionados. Por un lado, la acumulación excesiva de iones dominantes en la solución del suelo, como Cl^- o Na^+ , pudiendo alcanzar niveles tóxicos (Bernstein y Hayward, 1958; Iyengar et al., 1977; Greenway y Munns, 1980; Ashraf et al., 1986). Por otro, los desequilibrios nutricionales

que ocasiona la acumulación preferente de unos determinados iones frente al resto (Grattan y Grieve, 1992). Así, el descenso en la concentración de nitrógeno con la salinidad del suelo (Cram, 1973; Deane-Drummond y Glass, 1982) parece estar relacionado con el hecho de que el aumento de la captación y acumulación de Cl^- en la planta reduce la concentración de NO_3^- (Aslam et al., 1984; Ward et al., 1986; Klobus et al., 1988). Si bien se ha descrito que el aumento de NO_3^- en el medio disminuye la captación y acumulación de Cl^- (Berstein et al., 1974; Kafkafi et al., 1982; Feigin et al., 1987; Martínez y Cerdá, 1989).

La disponibilidad de fósforo para la planta disminuye en un suelo salino, ya que la concentración de P en el suelo está estrechamente controlada por procesos de desorción y por la solubilidad de los minerales de Ca-P (Grattan y Grieve 1992), la cual desciende conforme aumenta la salinidad (Sharpley et al., 1992). Si bien la salinidad puede aumentar las necesidades de P para ciertas plantas (Award et al., 1990), se ha podido comprobar que la adición de fósforo al suelo tiene efectos diversos sobre la planta que van desde el aumento, no afectación o incluso la disminución de la tolerancia a la salinidad (Champagnol, 1979).

Los iones K^+ y Ca^{++} están íntimamente relacionados con la tolerancia a la salinidad en las plantas y con la presencia de iones Na^+ en el medio. La concentración de K^+ en la solución del suelo suele ser baja debido a que este elemento es rápidamente adsorbido por la fracción mineral de éste. Sin embargo, la alta afinidad de las células de la raíz por el potasio frente al sodio, permiten a la planta satisfacer sus necesidades. Este grado de afinidad por el ión K^+ frente al ión Na^+ en suelos salinos varía con la especie y el cultivar. El estatus de potasio de la planta está relacionado con la relación Na^+/K^+ en el extracto de pasta saturada disminuyendo cuando la EPS de la fase cambiable aumenta. Así, la relación K^+/Na^+ en la planta ha sido utilizada en algunos cultivos como indicador de su tolerancia (Rathert, 1982; Kafkafi, 1984). Por otra parte, existen evidencias de que algunas especies pueden sustituir parte del potasio por sodio, como en algunas glicofitas, sin que se observe merma en su crecimiento. En este sentido, Marschner (1986), clasifica algunas especies cultivadas en varios grupos donde se incluyen desde especies como zanahoria (*Daucus carota* L.) o nabo (*Brassica rapa* L.), que pueden sustituir una alta proporción de potasio por sodio, hasta especies como lechuga (*Lactuca sativa* L.) o maíz (*Zea mays* L.) donde no se ha observado sustitución alguna sin que se vea afectado su crecimiento.

El Na^+ también interfiere con los iones Ca^{++} de la solución del suelo, pudiendo impedir su entrada en la planta (Lynch y Laüchli, 1985), y desplazando al Ca^{++} asociado a la membrana, dando lugar a un aumento de la permeabilidad y por tanto, disminuyendo la selectividad K^+/Na^+ (Cramer et al., 1987). Las interacciones entre los iones Na^+ y Ca^{++} desembocan en una serie de desórdenes fisiológicos que afectan al crecimiento y funcionamiento de la raíz y que guardan una estrecha relación con la proporción $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (Kent y Laüchli 1985; Mass y Grieve 1987; Cramer et al., 1987; Grieve y Mass, 1988). Estas variaciones descritas para el ión Ca^{++} , afectan al ión Mg^{++} dado su carácter antagonista.

Por último, la solubilidad de los micronutrientes en el sustrato se ve favorecida por la salinidad (Sharpley et al., 1992). Sin embargo, su concentración en la planta va a depender del tipo de planta, tejido, salinidad, concentración de micronutrientes y de las condiciones ambientales en las que se desarrolle.

Por ello, la capacidad de respuesta de las plantas a las acciones de la salinidad sobre los aspectos de energía, hidratación y nutrición conduce al concepto de tolerancia.

La tolerancia a la salinidad fue definida por Bernstein (1963) como el grado con el que la planta ajusta su potencial osmótico, con un sacrificio mínimo de su crecimiento o, por Shannon (1979), como la capacidad de una planta para soportar los efectos de una solución salina concentrada en la zona radicular.

Grado y capacidad son pues dos términos que implican una cuantificación o medida de la tolerancia, además del establecimiento de un criterio para realizarla. Mass (1986), considera tres criterios para analizar la tolerancia de las plantas a la salinidad: supervivencia, producción o biomasa absoluta y producción o biomasa relativa.

Los criterios de supervivencia y de producción absoluta, si bien tienen interés agronómico y el de producción absoluta un interés económico añadido, limita la posibilidad de comparación de diferentes cultivos.

El criterio de la producción relativa resulta más adecuado a la hora de realizar comparaciones tanto entre cultivos como entre cultivares (Nieman y Shannon, 1977). En este criterio, se relativizan las producciones obtenidas por los cultivos al comparar en diferentes tratamientos de salinidad con las producciones obtenidas por los mismos en ausencia de sal en el sustrato. La relación entre los valores relativos de producción así obtenidos y la conductividad eléctrica respectiva del sustrato queda representada por el ajuste de una función matemática (Mass y Hoffman, 1977; van Genuchten, 1983) cuyo estudio permite establecer el grado de tolerancia de los cultivos en consideración.

Los métodos que se siguen para estudiar la tolerancia se pueden clasificar en dos grupos: ensayos de campo y ensayos de laboratorio. Los ensayos de campo se realizan, bien en parcelas salinas naturales o en parcelas salinizadas artificialmente (Royo et al., 1987). En ambos casos, se presentan dificultades como son la persistencia de la variabilidad espacio-temporal de la salinidad, en el primer caso (Shannon, 1984) y el reducido número de niveles salinos e ensayar en el segundo, dado el coste que supondría aumentarlos.

Los ensayos de laboratorio abarcan desde los practicados en invernadero en una gran diversidad de sustratos y contenedores, hasta técnicas más sofisticadas como el cultivo in vitro de órganos o tejidos en medio salinizado (Dudeck et al., 1986; Croughan et al., 1978).

Las plantas se clasifican, según su comportamiento ante la sal en halófitas y glicófitas. La variación de comportamiento es muy amplia: desde las glicófitas más sensibles, que no crecen normalmente ni en contenidos muy bajos de cloruro sódico, hasta las halófitas más resistentes como *Rhizophora mangle*, que sólo sobrevive en salinidades próximas a la del agua del mar. Los mecanismos disponibles por las plantas mediante los cuales llegan a presentar diferentes grados de tolerancia persiguen dos objetivos fundamentales: la protección contra la pérdida de agua y la protección contra el efecto tóxico de los iones (Pasternak, 1987).

Para disminuir la pérdida de agua, algunas plantas disminuyen el número de estomas por unidad de superficie, facilitan el cierre de los estomas, aumentan el espesor de la cutícula o disminuyen la relación parte aérea/raíz (Papadopoulos y Rendig, 1983). Otras plantas recurren al denominado ajuste osmótico, que en algunas halófitas consiste en acumular NaCl en hojas y el aislamiento en vacuolas. (Läuchli y Epstein, 1984) mientras que en glicófitas está mas relacionado con la síntesis de sustancias orgánicas como prolina o glicinebetaina (Greenway y Muns, 1980). Este ajuste osmótico tiene como finalidad disminuir su potencial osmótico para poder mantener el flujo de agua del suelo a la raíz.

Los mecanismos de protección contra la toxicidad iónica se basan en la absorción y transporte selectivo de iones, compartimentalización de electrolitos, traslocación y excreción (Cram, 1983). También, en la concentración de iones salinos en órganos no especializados como raíces, hojas viejas, traqueidas o pecióslos con el fin de retrasar el daño a otras partes más sensibles en crecimiento. (Royo y Aragües, 1989).

Estas características son desarrolladas por diferentes tipos de plantas que presentan una cierta tolerancia a la salinidad del medio. Sin embargo, para paliar el efecto de la salinidad en los cultivos existen otros procedimientos. Dichos procedimientos siguen dos caminos: el manejo agronómico y la mejora genética.

El manejo agronómico está dirigido principalmente al control de la salinidad en la zona radicular mediante la dosificación y espaciado de los riegos; a minimizar los daños en las plantas mediante el empleo de abonos (Mass y Hoffman, 1977) y al empleo de patrones tolerantes (Pasternak, 1987), muy relacionado con los procesos de mejora genética.

La mejora genética de la tolerancia a la salinidad puede ser abordada por cualquiera de los procedimientos de selección empleados en mejora clásica, aunque persiste el problema de la escasez de conocimientos sobre marcadores fisiológicos o bioquímicos (Jana, 1987). A este problema hay que añadir la complejidad que entraña la búsqueda, debido a la ya mencionada variabilidad espacio-temporal de la salinidad y a la falta de conocimientos profundos de los mecanismos de tolerancia, además del coste que supone las operaciones de cribado a lo largo del ciclo de cultivo (Epstein y Rains, 1987). El hecho de que la tolerancia de un cultivar varíe con el ciclo de cultivo y con las condiciones ambientales impide además el desarrollo de un protocolo universalmente aceptado para este tipo de ensayos (Royo y Aragües, 1989). No obstante, la selección y mejora de plantas por su tolerancia a la sal es de máximo interés.

Junto a las estrategias antes mencionadas y desarrolladas por el hombre para paliar el efecto de la salinidad en los cultivos, existe otra, más antigua y extendida entre los seres vivos y desarrollada por la propia naturaleza, que consiste en el establecimiento de asociaciones entre individuos para mejorar su adaptación al medio, es la denominada simbiosis.

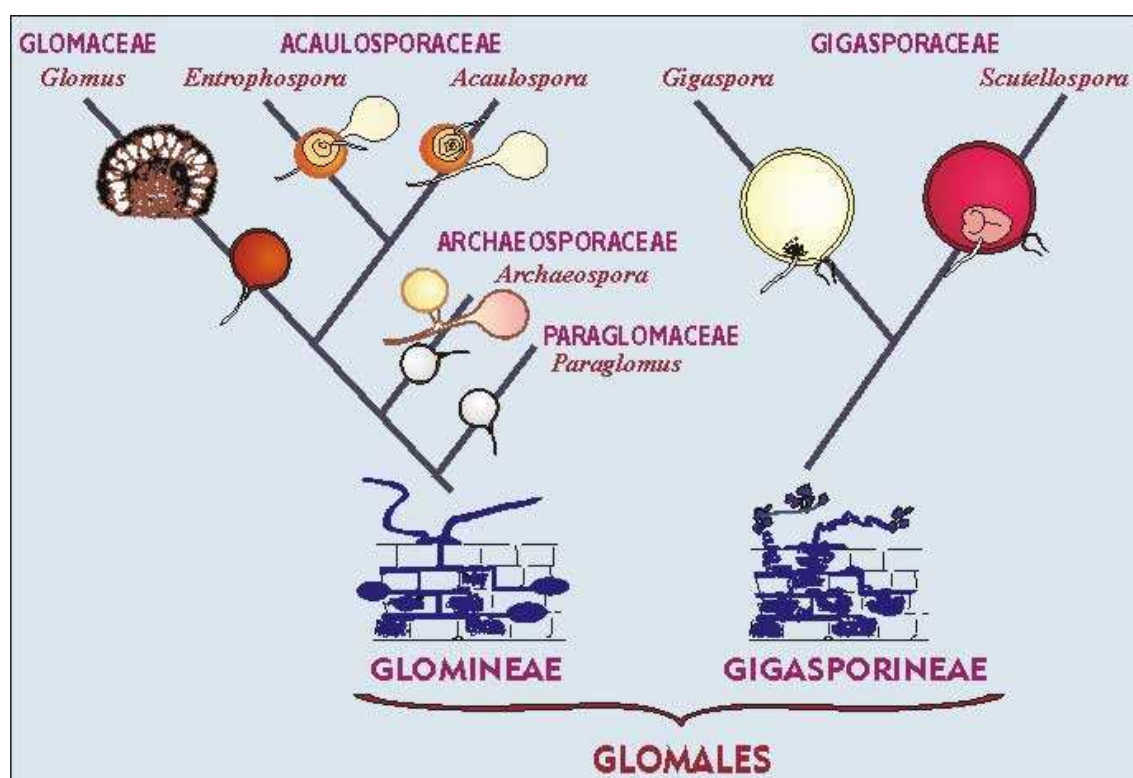
En el reino vegetal, además de las simbiosis alga-hongo (líquenes) o planta vascular-bacteria (Leguminosas-*Rhizobium*) existen otras asociaciones entre plantas vasculares y hongos denominadas micorrizas. Las micorrizas son simbiosis de tipo mutualista entre ciertos hongos del suelo y las raíces de algunas plantas superiores. En esta simbiosis la planta suministra al hongo los sustratos carbonados procedentes de la fotosíntesis, mientras que el hongo facilita la adquisición de los elementos minerales del suelo (Harley y Smith, 1983).

El origen de las micorrizas parece tan antiguo como el de las propias plantas. La presencia de estructuras fúngicas en los primeros registros fósiles de vegetales

conocidos, que vivieron hace 370 millones de años (Nicolson, 1975; Stubblefield et al., 1987), apoyaría la hipótesis de que las plantas llegaron a colonizar la superficie terrestre, a partir de un medio acuoso, gracias a que sus antecesores se asociaron con ciertos hongos que les ayudaron a superar los problemas de desecación y captación de nutrientes que implicaban el paso de un ambiente acuático a uno terrestre (Pirozinsky y Malloch, 1975). Los hongos que forman las micorrizas, son los hongos inferiores pertenecientes a la clase Zigomicotina, orden Endogonales, familia Endogonaceae.

Actualmente se distinguen siete tipos de micorrizas (Brundrett, 2002) de los cuales las micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) son las más extendidas entre las plantas, mientras que las ectomicorrizas sólo se producen en ciertas familias de gimnospermas y dicotiledóneas. Los otros tipos son específicos de alguna familia de plantas. Las MVA están muy generalizadas encontrándose en alrededor del 80% de las especies vegetales. Todos los hongos MVA están clasificados en los Zigomicetes, orden Glomales y en los géneros: *Glomus*, *Acaulospora*, *Scutellospora*, *Gigaspora*, *Paraglomus* y *Archaeospora*. (Morton y Redecker, 2001).

fig. 2. Clasificación de las Glomales (IVAM's, 2002).



Estos hongos son considerados como los más primitivos debido a su esporas simples, ausencia de reproducción sexual y porque existen muy pocas especies asociadas a una gran diversidad de plantas (Morton, 1990). Este tipo de hongos son incapaces de crecer en ausencia de planta y tampoco ha sido posible cultivarlos en condiciones axénicas.

La asociación micorrícica juega un papel esencial en los ciclos de materia y energía de ecosistemas con suelos generalmente pobres en agua y elementos minerales nutritivos, principalmente nitrógeno y fósforo (Read, 1991). La formación de micorrizas MVA, provoca normalmente una considerable estimulación del ritmo de crecimiento de la planta (Harley y Smith, 1983), que se traduce en un incremento en la producción de biomasa. Este efecto es mas importante en suelos de baja fertilidad o desequilibrados nutritivamente, especialmente cuando el contenido en fósforo asimilable es bajo (Abbott y Robson, 1984). Una mayor relación parte aérea -raíz en términos de peso seco es característico en plantas micorrizadas (Berta et al., 1990). En general el crecimiento de las plantas micorrizadas va a depender del balance entre el efecto promotor debido al aporte de nutrientes y el efecto depresor ejercido por el drenaje de compuestos carbonados. Las plantas micorrizadas desvían entre un 10 y un 20 % de la fotosíntesis neta, que es requerida para la formación, mantenimiento y funcionamiento de las estructuras micorrícicas (Jakobsen y Rosendahl, 1990).

El principal efecto de la infección de la raíz con micorriza está causado por el incremento en la absorción de fósforo (Bolan et al., 1987). Típicamente en plantas micorrizadas la concentración de P por unidad de peso seco es mayor que en las plantas no micorrizadas y por tanto una menor eficiencia en la utilización de P (Koide, 1991).

Aunque puede decirse que las MVA mejoran las relaciones hídricas en plantas, induciendo un aumento de la conductividad hidráulica, no parece ser un efecto directo de la infección con estos hongos sino más bien una consecuencia de un mejor estado nutricional y especialmente en fósforo (Barea, 1991). En diversos experimentos se han puesto de manifiesto incrementos en la concentración de nitrógeno en plantas como consecuencia de la formación de MVA. Los hongos MVA son capaces de utilizar NH_4^+ y NO_3^- (Butler, 1987) y de metabolizar NH_4^+ vía glutamino sintetasa (Smith et al., 1985). Con respecto a otros nutrientes, se ha podido constatar una menor concentración de K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} . Con respecto a los micronutrientes, se ha puesto de manifiesto que en plantas micorrizadas la concentración de cinc y cobre son superiores a la de las plantas no micorrizadas (Lambert y Weidensaul, 1991). El descenso en la concentración

de Mn^{++} parece ser un efecto indirecto debido a los cambios que las MVA inducen en la rizosfera y en particular en el descenso de reductores de Mn^{++} (Kothari et al., 1991). También se han encontrado concentraciones de hierro y boro menores en plantas micorrizadas.

Varios trabajos llevados a cabo en campo (Davies et al., 1992) atribuyen a la micorriza un efecto protector frente situaciones de estrés tanto biótico como abiótico, que se argumentan en gran parte por la estimulación del crecimiento. Incluso algunos investigadores (Allen y Allen, 1986) consideran que el efecto de la micorriza sólo tiene lugar durante periodos de estrés.

Debido a las consecuencias que una elevada salinidad tiene sobre la captación de nutrientes, balance energético y balance hídrico y a los efectos que la micorriza realiza sobre estos mismos factores, es importante considerar el papel de las micorrizas MVA en este contexto. En este sentido son numerosos los estudios que consideran la importancia de la simbiosis MVA en el crecimiento y nutrición de plantas desarrolladas en hábitats salinizados (Hirrel y Gerdemann, 1980; Pond et al., 1984).

El mecanismo por el que se consigue esta reducción del estrés puede estar relacionado con la mejora en la nutrición fosforada (Hirrel y Gerdemann, 1980; Ojala et al., 1983). El hecho de que también se mejoren las relaciones hídricas y la capacidad fotosintética puede estar relacionado con el aumento en el contenido de potasio, observado en plantas micorrizadas y por tanto una relación K/Na más alta en estas (Allen y Cunningham, 1983; Pons et al., 1983). Con respecto a la nutrición de la planta varios autores confirman que la micorriza aumenta el crecimiento aumentando la absorción de nutrientes y en particular P, Cu y Zn (Gilmore, 1971; Rhodes y Gerdemann, 1975; Timmer y Leyder, 1978; Tinker, 1978). También se ha encontrado un descenso en la concentración de Cl^- en plantas de *Parthenicum argentatum* Gray micorrizadas cuando crecen en ambientes salinos, en comparación con plantas no micorrizadas (Pfeiffer y Bloss, 1988).

El incremento de prolina como consecuencia de la salinidad en lechuga (*Lactuca sativa* L.) fue considerablemente menor en plantas colonizadas por *Glomus fasciculatum* (Thaxter sensu Gerd.) y *Glomus deserticola* (Trappe, Bloss et Menge) que en plantas no inoculadas o inoculadas con *Glomus mosseae* (Nicol. et Gerd.), lo que indicó que las plantas micorrizadas con los dos primeros hongos estuvieron menos afectadas por la salinidad (Ruíz-Lozano et al., 1996). Estos autores no encontraron diferencias en el contenido de P entre plantas micorrizadas y plantas no micorrizadas

con aportes de P, por lo que sugieren que los mecanismos por los cuales estos hongos alivian el estrés salino puede estar basados en procesos fisiológicos como un incremento en la tasa de intercambio de CO₂, transpiración, conductancia estómatica y eficiencia en la utilización de agua.

Por otra parte, se observó un descenso en la concentración de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ en plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L) micorrizadas.

Una mayor acumulación de betaína en plantas de naranjo micorrizadas con respecto a sus controles fue descrita por Duke et al (1986), en diferentes concentraciones de sal.

Sin embargo, no todas las MVA aumentan el crecimiento en suelos salinos (Azcón et al., 1976; Hirrel y Gerdemann. 1980; Rosendahl y Rosendahl. 1991).

La importancia de las MVA varía entre plantas consideradas micorriza obligada y no obligadas. Entre estos dos grupos existen otras plantas consideradas micorriza-facultativas, que pueden diferir ampliamente en su respuesta a la micorrización y que requieren una experimentación individual para determinar el beneficio fisiológico de esta asociación (Janos, 1980).

Una de las especies que es considerada en la actualidad como micorriza obligada es la mandioca, cassava o yuca, (*Manihot esculenta* Cranz).

La mandioca es un arbusto (fig. 3) perteneciente al género *Manihot*, familia Euforbiaceae, subfamilia Crotonoideae y tribu manihoteae; comprende más de trescientos géneros y ocho mil especies, en su mayoría tropicales. Todas las especies del género *Manihot* son diploides y tienen 36 cromosomas.

La mandioca tiene una gran capacidad de propagarse agámicamente por lo que tradicionalmente se viene multiplicando por estaquillas.

Este sistema da lugar a raíces adventicias de tipo rastrero, que pueden alcanzar hasta 1,4 mts de longitud y en las que se forman tubérculos que constituyen la parte fundamental de su aprovechamiento. Los tubérculos son fusiformes tendiendo a cilindrocónicos y con un tamaño de 20 a 60 cm de longitud y de 5 a 15 cm de diámetro. La parte del cilindro central, delimitada por el cambium vascular, constituye la parte esencial del tubérculo debido a su riqueza en almidón, siendo la parte central la que posee menor contenido en cianoglucósidos. De un mismo esqueje se pueden llegar a formar hasta tres troncos que por desarrollo de las yemas subapicales producen generalmente tres ramas de tipo simpodial. La precocidad de la ramificación, dentro de una misma variedad, depende de la posición de la yema en la planta (Miege, 1957;

Medard, 1973). Las ramas más jóvenes son de color verde, verde-amarillento o rojo según la variedad, mientras que las ramas viejas y tallos lignificados son de color blanco plateado, gris verdoso, marrón o amarillo.

fig. 3. Planta de mandioca con tubérculos.



Las hojas simples alternas y caducas, están dispuestas en espiral según un índice filotáxico de 2/5. Los peciolo son alargados y su coloración varía entre rojo y verde púrpura. En la planta adulta el limbo foliar está dividido en 5 o 7 lóbulos y sólo las primeras hojas de la planta procedente de semilla u obtenidas in vitro aparecen como enteras.

La coloración del limbo es verde o rojo fuerte. Las hojas situadas en la base, de más edad, caen y son reemplazadas por aquellas que se forman en las yemas terminales de las ramas, adquiriendo la planta un aspecto hemiesférico,

Ciertas variedades no florecen nunca, bien debido a la falta de inducción floral o al aborto de las yemas florales. Las inflorescencias son racimos de flores unisexuales. La flores masculinas son numerosas y se abren por la parte superior de la inflorescencia; las femeninas son escasas y se sitúan en la base, abriéndose en primer lugar. Tras una fecundación entomógama se produce un fruto cápsula dehiscente con un tamaño de entre 1 y 1,5 cm de diámetro, con tres lóculos que portan cada uno de ello una semilla. La semilla es ovalada y moteada, de color pardo-rojizo estando provista de carúncula. El tegumento seminal es bastante espeso (0,3 cm) en la madurez.

Actualmente se admite que el origen de la mandioca se encuentra en México y en América Central (Guatemala y Honduras), y en segundo lugar en las regiones limítrofes de América del Sur y probablemente en las Sabanas de Venezuela.

El cultivo de la mandioca se inició probablemente en las zonas semiáridas de América Central (Vavilov, 1951; Silvestre y Arrendeau, 1983); siendo introducida en Africa hacia mediados del siglo XVI por los portugueses que viajaban entre Brasil y la costa oeste de este continente. De aquí pasó al Congo y un poco más tarde a Asia y Oceanía.

La mandioca se siguió introduciendo a lo largo del siglo XVIII por multitud de puertos de la costa Este y Oeste de Africa desde donde se expandió rápidamente por la mayoría de los países de Africa Central.

Actualmente es Africa el continente con la producción más elevada aunque le sigue muy cerca Asia (fig. 4).

La mandioca está considerada como una planta rústica porque se adapta a condiciones edafoclimáticas variadas que pueden ser desfavorables para otras especies. Su cultivo se localiza entre los 30° de latitud Norte y Sur (fig. 5).

En general, el cultivo de mandioca está limitado por las medias anuales de temperatura y pluviometría situándose en torno a los 20 °C y entre los 1000 y 3000 mm de lluvia.

Los suelos requeridos por la mandioca son extremadamente variados siendo característico su cultivo en zonas marginales de escasa fertilidad (Cock 1982). No obstante, suele tener mejores rendimientos en suelos profundos con textura ligera, estructura estable y buena reserva de agua (Silvestre y Arrandea, 1983).

fig. 4. Tendencia de la producción de mandioca en el mundo.

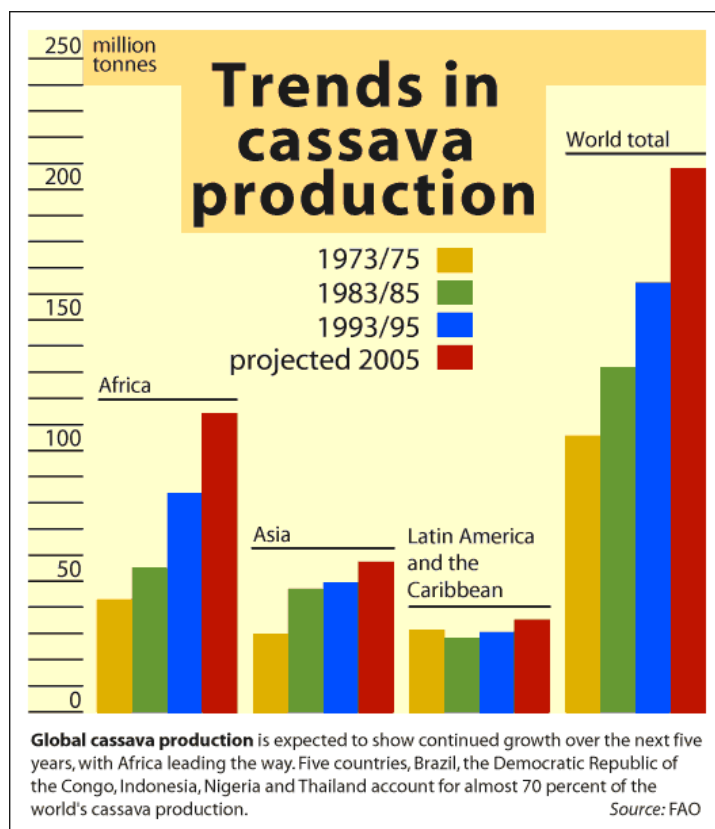
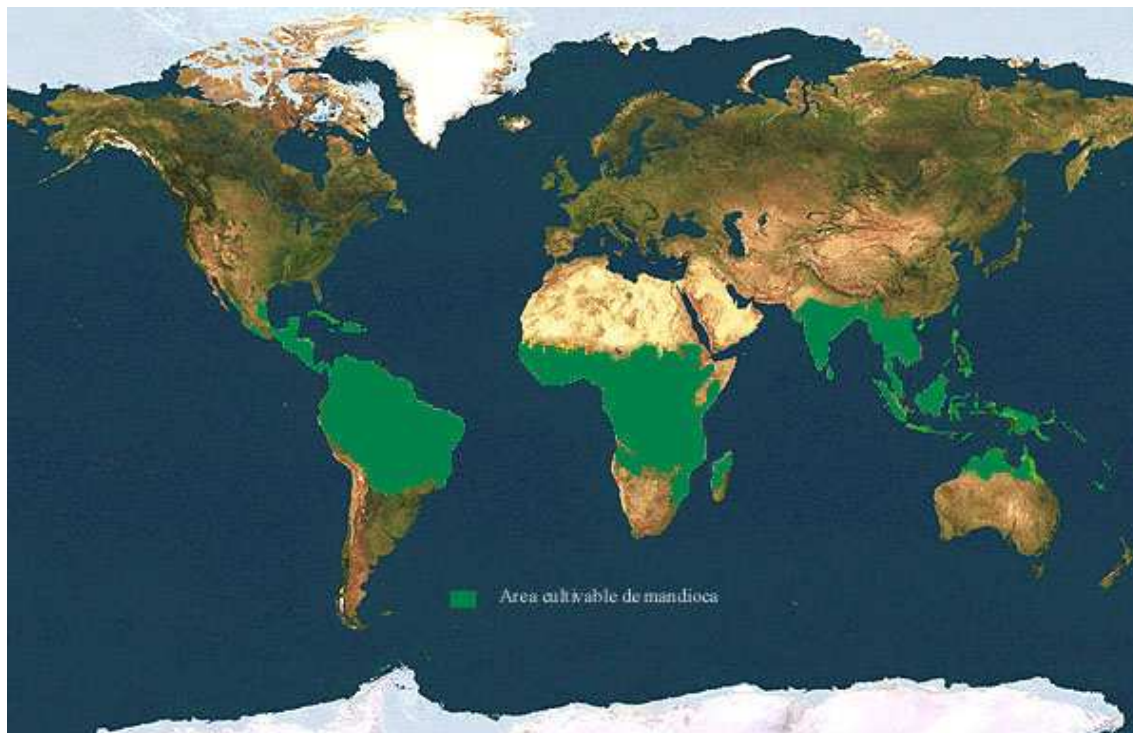


fig. 5. Distribución geográfica de la mandioca en el mundo (FAO, 2002).



El tubérculo de la mandioca es un alimento esencialmente energético, rico en almidón, con alto contenido en ácido ascórbico, pero pobre en lípidos, sales minerales y algunas vitaminas. El almidón de la mandioca es de una excelente digestibilidad. Por el contrario, las hojas presentan un alto contenido en proteínas, aunque no tengan un buen equilibrio (déficit en metionina y alto contenido en lisina) (Gómez y Noma, 1986).

La mandioca constituye el mayor aporte de calorías, tanto para el hombre como para el ganado, en numerosos países pobres.

En alimentación humana se puede consumir en fresco en el caso de variedades dulces (bajo contenido en CNH) y previa maceración o cocción para las variedades amargas.

El consumo de mandioca en la alimentación animal aumenta particularmente en Europa, donde tiende a sustituir a los cereales como alimento energético.

El almidón de mandioca está siendo muy utilizado por la industria, compitiendo con los almidones procedentes de maíz y de patata.

Las técnicas de cultivo de células, tejidos y órganos, están bastante desarrolladas en muchos laboratorios de investigación en todo el mundo y se están usando en muchas áreas de Biología Vegetal. Desde el cultivo de óvulos y flores aisladas, anteras y microesporas, pasando por embriones somáticos (embrión asexual obtenido de una célula o grupo de células), se han desarrollado métodos para propagar plantas en general, bien mediante germinación de semillas *in vitro*, cultivo de embriones cigóticos o yemas apicales o

axilares. La técnica de cultivo tejidos vegetales “in vitro” consiste en el cultivo sobre un medio nutritivo, en condiciones estériles y aisladas (dentro de un contenedor normalmente de vidrio) de parte o la totalidad de una planta. Se basa en los principios de autonomía y totipotencia celular de la célula vegetal.

Se sabe que una de las rutas donde las células vegetales en cultivo pueden manifestar su totipotencia es la organogénesis, que conduce a la diferenciación de meristemas caulinares y/o radicales (que originan tallos o raíces adventicias, respectivamente) a partir de órganos de la planta como las yemas apicales o axilares. La organogénesis implica la formación de estructuras monopolares que establecen conexión vascular con el tejido del que derivan.

La primera condición para el éxito de un cultivo "in vitro" es la asepsia, ya que los medios en que se desarrolla el tejido vegetal son muy favorables para la proliferación de bacterias, hongos y otros contaminantes. Se crea, por consiguiente, la necesidad de la eliminación total de microorganismos, tanto en el instrumental de trabajo como en el material vegetal.

Los principales métodos de eliminación de las fuentes de infección son:

- *Uso de productos químicos*, como hipoclorito de sodio (lejía comercial), hipoclorito de calcio, mercurbutol, bicloruro de mercurio, productos bactericidas y fungicidas, etanol a 70-80°C y agua oxigenada, que destruyen microorganismos.

- *El calor*, tanto producido por la llama de un mechero Bunsen como el calor húmedo a presión en autoclave (120°C y 1 atm.) durante determinados tiempos de esterilización que dependen del volumen de material a esterilizar.

- *Utilización de sistemas de filtración de aire forzado* tales como filtros especiales que no dejan pasar partículas cuyo diámetro sea superior a 0.22 μ (cámara de flujo laminar). El flujo de este aire origina una presión que impide el acceso de aire contaminado desde el exterior al interior de la cabina.

La esterilización del material vegetal debe realizarse de tal forma que los productos empleados no dañen los tejidos. Consecuentemente, hay que respetar todo lo posible los tiempos de esterilización. Las dificultades aparecen cuando hay presencia de heridas, ceras, tejido de naturaleza rugosa, presencia de pelos (tricomas), etc.

Los factores físicos ambientales determinantes en el cultivo de tejidos "in vitro" son las necesidades de luz, la temperatura y el medio de cultivo. Las primeras se pueden descomponer en tres parámetros: la intensidad, la duración de la iluminación y la calidad de la luz.

La intensidad (potencia luminosa por unidad de superficie) viene expresada en W/m^2 , y habitualmente, en las salas de cultivo de tejido, varía de 23.25 a 116.27 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (1000 a 5000 lux) con una utilización muy corriente de 46.51 a 69.76 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se sabe que una baja intensidad favorece la formación de callo, mientras que una intensidad alta fortifica y desarrolla los tallos.

En cuanto a la duración de la iluminación, en la práctica la mayor parte de los cultivos "in vitro" se desarrollan con un fotoperíodo de 16 a 18 horas/día. Sin embargo, según algunos autores, parece que en la mayoría de los casos el factor más importante es la cantidad de energía luminosa recibida (intensidad por fotoperíodo).

La calidad de la luz fue estudiada por Seibert et al., (1975) sobre tallo de tabaco; la luz azul (banda espectral centrada alrededor de 419 nm) induce la formación de yemas y la luz roja (660 nm) induce la rizogénesis.

La temperatura de las cámaras de cultivo de tejidos vegetales está habitualmente regulada de forma constante a 24 –26 °C. La temperatura real del tejido en el interior de los recipientes puede ser superior de 2 a 3 °C a la de la cámara, debido a la radiación lumínica.

Se emplea una temperatura baja para la formación de yemas florales, ruptura de dormancia y germinación de semillas, una temperatura muy baja para detener el crecimiento del cultivo (almacenamiento en frío), y una temperatura muy elevada, 37-38 °C, para tratamientos de termoterapia cuyo fin es la eliminación de virus en plantas afectadas. También se aplica en ocasiones una alternancia de temperatura, (26 °C/día y 15 °C/noche).

Un medio de cultivo es una solución acuosa que contiene una parte mineral, que aporta a la misma N, P, K, Ca, S y Mg, Fe, Zn, B, Mn, Cu, I, Co, Ni, Al y Mo. Además, se incorpora una parte orgánica (azúcares, vitaminas, aminoácidos, fitohormonas o reguladores de crecimiento). Esta solución acuosa está solidificada en la mayor parte de los casos por agar-agar.

Los minerales presentes en el medio de cultivo pueden usarse por los tejidos y células de las plantas como ladrillos para la síntesis de moléculas orgánicas o como

catalizadores en reacciones enzimáticas. Los iones de las sales disueltas juegan un importante papel en el transporte de moléculas por la planta, en la regulación osmótica y en el mantenimiento del potencial electroquímico de la planta.

Las composiciones minerales más usadas se conocen con el nombre de sus autores, así, de las primeras empleadas fueron Knop (1865) y White (1943). Para el cultivo de callo las más usadas son Gamborg (1968), Gautheret (1959), Heller (1953). Para cultivo de raíces White (1963). Para cultivo de órganos Gamborg (1968) y Morel (1975). No obstante, el de uso más generalizado es el Murashige y Skoog (1962), rico en amonio, fósforo y azufre.

Aunque las plántulas cultivadas "in vitro" son verdes y poseen clorofila, su función fotosintética está muy reducida, ya que aún no se han formado los enzimas necesarios. Por ello, como fuente de carbono se usa hidratos de carbono, generalmente *sacarosa* (1-3%). Trabajos realizados desde 1987 (Thompson and Thorpe, 1987) demuestran que la fuente hidrocarbonada del medio de cultivo no sólo desempeña una función nutritiva, sino que también ejerce un efecto importante sobre la morfogénesis a través de sus propiedades osmóticas.

Los azúcares secundarios (*mio-inositol*) mejoran la división celular y participan en la formación de la pared celular.

Aunque el nitrato da lugar a aminos en las células, en algunos casos se deben adicionar aminoácidos, glicina o cisteína, como nitrógeno reducido.

Son fundamentales las vitaminas del grupo B. Así la B1 (*tiamina*), mantiene los ápices caulinares y la B6 o *piridoxina*, es importante en el metabolismo de los aminoácidos. La *biotina* es un cofactor de la actividad auxínica. El *pantotenato* de Ca es fundamental en la respiración.

La *vitamina C* ó *ácido ascórbico* es un antioxidante. También se incluyen, a veces, el ácido nicotínico o vitamina PP y el *ácido fólico*.

Los *reguladores de crecimiento* son los compuestos orgánicos que, en pequeñas cantidades, inhiben, promueven o modifican algún proceso fisiológico que a su vez origina la inhibición o estímulo del crecimiento y la organogénesis. Hasta el momento, la hipótesis mas aceptada para explicar el modo de acción de los reguladores del crecimiento en la organogénesis postula que dicho proceso está regulado por cambios en los niveles hormonales endógenos de auxinas y citoquininas, Esta hipótesis está basada en los trabajos de Skoog y Miller en 1957 que demuestran que la concentración relativa de auxinas y citoquininas exógenas regula la formación de órganos en cultivos de callo

de médula de tabaco. De acuerdo con este modelo, la diferenciación de yemas vegetativas (caulogénesis) es promovida por balances auxina/citoquinina favorables a las citoquininas, mientras que los balances favorables a las auxinas inducen la formación de raíces (rizogénesis).

La manipulación de las concentraciones de auxinas y citoquininas en los medios de cultivo permite controlar la organogénesis *in vitro* de muchas especies vegetales, constituyendo además la base de gran parte de los protocolos de propagación vegetativa *in vitro* (micropropagación) existentes en la actualidad.

La micropropagación es una de las aplicaciones de la técnica de cultivo de vegetales "in vitro" de mayor interés, vía organogénesis, ya que ofrece las siguientes posibilidades:

- Proporciona un alto factor de multiplicación por lo que permite una gran rapidez de propagación de plantas idénticas a la de partida (madre). Este aspecto es muy válido, en particular, para la selección clonal.

- Ayuda a la propagación de variedades con dificultades de adaptación o problemáticas para propagarse por otros sistemas mas tradicionales.

- Facilita la constitución de colecciones de plantas madres, al permitir el almacenamiento de grandes cantidades de miniplantas (que se utilizarán como pies madres) sobre pequeñas superficies. Asimismo, facilita el intercambio de este germoplasma entre países.

- Contribuye a salvar especies en vías de desaparición.

- Permite la propagación durante todo el año, sin estar condicionado por la estación climatológica.

La *micropropagación* consiste en tomar de la planta madre un órgano o un trozo de éste, lo que se denomina "explanto", y bajo condiciones asépticas, someterlo a sucesivos cultivos "in vitro" hasta obtener nuevas plantas semejantes a la inicial. Estos cultivos

sucesivos constituyen las diferentes fases de la micropropagación que se pueden concretar como sigue:

Fase 0.- Preparación del material madre. La planta original, que condiciona todo el cultivo ulterior, debe presentar las mejores características agronómicas y sanitarias, para contar con un material de partida en las mejores condiciones posibles. En general, se comportan mejor los explantos si proceden de plantas madres cultivadas en invernadero.

Fase 1.- Establecimiento del cultivo aséptico. El objetivo de esta fase es obtener un cultivo libre de todo microorganismo (hongos, bacterias, etc.) procedente de la especie que se quiere multiplicar. Por ello, esta etapa se considera satisfactoria si un número adecuado de explantos sobrevive sin contaminación y se mantiene un crecimiento rápido.

Fase 2.- Multipliación propiamente dicha. El fin de esta etapa es llevar a cabo la multiplicación de órganos y estructuras que son capaces de dar lugar a nuevas plantas completas e intactas. Los brotes producidos en esta etapa pueden considerarse como propágulos en el sentido de su uso para propagar una nueva planta o cultivarse de nuevo con el fin de incrementar su número.

La mayoría de las investigaciones realizadas en esta fase de la micropropagación, han centrado la atención en establecer el nivel óptimo de sales orgánicas, vitaminas, reguladores de crecimiento y de otros aspectos químicos para el desarrollo óptimo de una determinada especie o variedad en una fase específica del proceso. También, recientemente se ha demostrado que en cultivos en medios sólidos o semisólidos la concentración de agar en el medio influye en el nivel de proliferación ciertas especies. Otro parámetro físico que influye en la proliferación es el tamaño del contenedor del medio.

Fase 3.- Preparación de los propágulos o plántulas para su transferencia a tierra. Un método de micropropagación eficaz debe mantener un alto porcentaje de plántulas vivas después de la salida del recipiente de cultivo. La fase 3 tiene por objeto preparar las plántulas para este fin, ya que concluida la fase 2, las plantas, por lo general, son pequeñas e incapaces de soportar las condiciones en suelo. Por ello, se puede subdividir esta tercera etapa en: 3.a) elongación de las plántulas formadas en la fase 2 y 3.b) enraizamiento "in

vitro" o "extra vitrum" de las plántulas crecidas en 3.a. En esta fase hay que tener en cuenta el balance auxinas-citoquininas.

Fase 4.- *Transferencia al ambiente natural.* Si esta fase no se realiza cuidadosamente pueden producirse muchas pérdidas debido, por un lado, a que las jóvenes raíces formadas en tubo tienen una epidermis no suberificada, por otro a que las plantas cultivadas asépticamente, que crecen en alta humedad relativa (HR), a menudo sufren estrés hídrico cuando se exponen a baja HR. Este estrés hídrico es la causa más grave de pérdidas en el proceso de adaptación de plantas cultivadas "in vitro" a condiciones de invernadero.

Las hojas de las plantas cultivadas en un medio controlado "in vitro" difieren anatómicamente de las de invernadero, ya que tienen menos ceras epicuticulares, células en empalizada más pequeñas y más aire intercelular en las células del mesófilo. Algunos autores sugieren que la baja respuesta del estoma también contribuye a este estrés.

Por ello, en esta fase se deben situar las plantas en una atmósfera con una humedad relativa máxima durante un período de una a tres semanas a 15-25°C cuidando que en estas condiciones, no se desarrollen enfermedades de tipo fúngico.

Un método poco costoso y práctico (Cantos et al., 1993) puede llevarse a cabo cuando las plantas hayan alcanzado el desarrollo adecuado, trasladarlas a vasos de plástico de 330 cc de capacidad con substrato de turba. El conjunto vaso-planta, se cubre con una bolsa de polietileno transparente y se pulveriza con agua para crear un ambiente de elevada humedad interna. A intervalos de dos días durante 10 días, se perfora paulatinamente la cubierta plástica y bajo frecuentes controles, a fin de comprobar que la planta no sufra deshidratación, se retira la bolsa para llegar al contacto total entre la planta y el ambiente externo. Una vez asegurada la supervivencia de la planta, se traslada ésta a maceta de mayor volumen (2 l.) y se lleva a invernadero aséptico.

III. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo es la evaluación de la tolerancia a la salinidad tanto in vitro como en condiciones de invernadero, de tres clones africanos de mandioca (*Manihot esculenta* Cranz), para en su caso poder ser cultivadas en áreas árido-salinas.

Para la obtención de este objetivo principal se consideraran los siguientes objetivos parciales:

- a. Determinación de las condiciones óptimas para la propagación in vitro de explantos de mandioca y comportamiento de este material vegetal ante la presencia de concentraciones crecientes de NaCl en el medio de cultivo. Clasificación del material considerado por su tolerancia a la salinidad.
- b. Definición del comportamiento ante la sal de plantas de los tres clones de mandioca cultivadas en invernadero. Clasificación por su tolerancia y comparación con la clasificación obtenida in vitro.
- c. Determinación de la influencia del tratamiento con micorrizas vesículo arbusculares (MVA) sobre el desarrollo de plantas de los tres clones de mandioca al ser trasplantadas desde in vitro a condiciones externas y sobre su tolerancia a la presencia de sal en la solución nutritiva.
- d. Caracterización del comportamiento in vitro y tras el trasplante a condiciones externas, de material procedente de plantas de mandioca micorrizadas en invernadero.

IV. PROPAGACION IN VITRO

IV.1. INTRODUCCION

Como se ha indicado, la mandioca es una especie monoica y altamente heterocigótica. Debido a esta heterocigosis, cuando se pretenden conservar unos caracteres genéticos determinados, se propaga vegetativamente mediante estaquillado (Kamalam et al., 1977; Wholey y Cock, 1978). Como en otros tantos cultivos, las tasas de propagación alcanzadas mediante cultivo in vitro de yemas apicales son considerablemente mayores que las conseguidas por los métodos tradicionales (Stamp y Henshaw, 1986). Ello, unido a otras ventajas importantes del cultivo en medio controlado, como la independencia de la época estacional, de gran importancia en plantas tropicales, el almacenamiento en espacios reducidos, y en especial su uso como método de selección de variedades mas tolerantes a estrés, tanto de tipo abiótico como biótico, hace que el uso de la técnica de micropropagación para esta especie sea de gran interés. Además, el cultivo “in vitro” es un método apropiado para poder aplicar metodologías tanto biotecnológicas, como de ingeniería genética.

Son bien conocidos los protocolos para el cultivo in vitro de meristemas y explantos nodales de mandioca, tanto para propagación (Protuguez y Mogilner, 1967; Konan et al., 1994, 1997; Li et al., 1998) como para obtener plantas sanas y libres de virus (Fereol, 1978; Kartha y Gamborg, 1978; Kaiser y Teemba, 1979; Roca y cols, 1980; Adapare y Coutts, 1981) en algunos casos asociando el cultivo de meristemas apicales a la termoterapia. En 1974, Kartha et al., optimizaron un medio para el cultivo de meristemas caulinares, empleando la solución mineral MS (Murashige y Skoog, 1962), con adición de las vitaminas del medio B5 (Gamborg et al., 1968) y suplementado además con ANA, BA y GA a 1,0, 0,5 y 0,1 μM respectivamente. Más tarde, se estableció que la adición de BA (0,5 μM) en presencia de ANA y GA, mejoraba la regeneración y que el GA₃ tenía efectos estimulantes en el crecimiento de la mandioca (Nair y cols., 1979). Así pues, estos últimos autores prestaron atención especial a la influencia de los reguladores de crecimiento encontrando que la BA fue la mejor citoquinina frente a zeatina, kinetina ó 2iP, en conjunción con 0,18 ó 0,018 mg l^{-1} de ANA y 0,035 mg l^{-1} de GA₃. Roca (1986), encontró

que niveles de $0,11 \text{ mg l}^{-1}$ de BA promovieron iniciación de tallo y crecimiento y que concentraciones elevadas de BA (2 mg l^{-1}) retardaron el crecimiento del tallo, inhibieron la formación de raíces y estimularon la formación de callo. La adición de ANA al mismo medio, indujo una formación excesiva de callo y raíces. Zok et al. (1992), propusieron como adecuado para el desarrollo vegetativo de mandioca in vitro, el medio MS con BA a $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ y ANA a $0,01 \text{ mg l}^{-1}$ de concentración. Mas recientemente, Bhagwat et al. (1996), ensayaron el uso del TDZ (N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea) compuesto relacionado con la fenilurea con efecto tanto auxínico como citoquinínico (Mok et al., 1982 ; Visser et al., 1992). El TDZ posee una poderosa capacidad de estimulación de organogénesis de brotes de algunas especies leñosas (van Nieuwkerk et al., 1986; Chalupa et al., 1988; Yusnita et al., 1990; Huetteman y Preece, 1993; Lu 1993). Bhagwat et al., (1996) indicaron que después de mantener explantos nodales en un medio MS líquido con $0,11$ y $0,22 \text{ } \mu\text{M}$ de TDZ durante 6 a 8 días, se trasplantaron a un medio sólido con $2,2 \text{ } \mu\text{M}$ de BA y $1,6 \text{ } \mu\text{M}$ de GA_3 , encontrando que el desarrollo iniciado en la fase de tratamiento inducido por TDZ se mantuvo en el medio sólido, obteniéndose una media de 31,5 brotes por explanto a las 10 semanas de cultivo. Estas respuestas positivas se generalizaron para ocho genotipos diferentes.

Resultados obtenidos por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) en 1980, mostraron que el aumento en la concentración de sacarosa desde $0,03$ a $0,06 \text{ M}$ potenció el efecto de bajas concentraciones de BA sobre la elongación del tallo a partir de meristemas. En estas mismas condiciones, se observó un incremento del desarrollo radicular. Al aumentar la concentración de BA manteniendo la concentración de sacarosa en los niveles más altos citados, se incrementó también la formación de callo. Incrementos mayores de la concentración de sacarosa causaron oscurecimientos de la raíz y deterioro en los tejidos aéreos, probablemente como consecuencia del estrés osmótico.

Noerhadi y Widiyanto (1982) demostraron que es posible la obtención de callos y raíces a partir de fragmentos de hojas y peciolo. Mabanza (1981) obtuvo la neoformación de plantas a partir de meristemas caulinares, e igualmente a partir de cotiledones extraídos de semilla (Mabanza y Jonard, 1984). Medard en 1985, hizo un estudio detallado sobre las etapas de la morfogénesis foliar de mandioca.

A pesar de las dificultades impuestas inicialmente por el comportamiento irregular de las plantas de mandioca obtenidas con los diferentes sistemas de propagación in vitro, (Tilquin, 1979), en las dos últimas décadas se han desarrollado metodologías, como la embriogénesis (Liu y Chen, 1977) o el uso de brotes adventicios, con vistas a la

modificación genética. Ello ha tenido una amplia repercusión en la biotecnología de dicha especie. Los intentos mas recientes de desarrollar sistemas de regeneración in vitro para investigaciones desde el punto de vista molecular o celular se han centrado principalmente en la embriogénesis somática. Stamp y Henshaw (1982 y 1987) realizaron diversos trabajos sobre embriones somáticos primarios y secundarios y embriones cigóticos. Choi et al., (1987) estudiaron las características bioquímicas de embriones somáticos y Sofiari et al., (1997) compararon la acción de ANA y 2,4-D sobre la inducción de embriones somáticos a partir de discos de hoja de siete cultivares de mandioca, encontrando que el 2,4-D es el único que induce embriones primarios y que ambos reguladores inducen embriones secundarios. Ma, (1998) indicó que las citoquininas benciladenina y TDZ estimulan la organogénesis de brotes mas que la kinetina y N-isopentiladenina, mientras que las auxinas inducen de forma efectiva la embriogénesis somática. Aparte de su evidente aplicación para propagación, se han utilizado los callos de embriones somáticos para aislar protoplastos (Sofiari et al., 1998) o para estudiar efectos relacionados con la cianogénesis (Joseph et al., 1999) . En relación a la embriogénesis cigótica, Fregene et al., (1998), obtuvieron un alto porcentaje de plantas rescatadas precozmente de semillas usando embriones cigóticos inmaduros. A pesar de los últimos adelantos en este sistema, la aplicación eficiente de esta técnica para la transformación genética de la mandioca no es aun sencilla debido, entre otras causas a la dependencia del genotipo (Bhagwat et al., 1996)

Dentro de las fases de la micropropagación definidas por Murashige (1974) una de las mas problemáticas es la transferencia al ambiente natural. Si esta fase no se realiza cuidadosamente pueden producirse muchas pérdidas debido, por un lado a que las jóvenes raíces formadas in vitro tienen una epidermis no suberificada y sufren daños en el proceso de trasplante (Gribaudo et al., 1995), y por otro, a que las plantas cultivadas asépticamente, crecen en alta humedad relativa (HR), en el interior del frasco de cultivo y al pasar al exterior con menor HR sufren a menudo pérdidas elevadas de agua. Las hojas de las plantas cultivadas "in vitro" difieren anatómicamente de las de invernadero, ya que tienen menos ceras epicuticulares (Zaid y Hughes, 1995), células en empalizada más pequeñas y más aire intercelular en las células del mesófilo. Por ello, el estrés hídrico que sufre la planta transferida de alta a baja HR se atribuye a estas particularidades anatómicas (Sutter y Langhans, 1979; Zacchini y Morini, 1998). Estos últimos autores sugirieron que la baja respuesta del estoma también contribuye a este estrés. Ziv et al., (1987) indicaron que los estomas en la epidermis de hojas cultivadas "in vitro" de clavel no se cierran como respuesta a la oscuridad, plasmolisis, AAB o Ca^{++} , factores que motivan el cierre de los

poros estomáticos en condiciones normales. Este comportamiento obedece a cambios en las propiedades mecánicas de la pared celular de las células guarda que responden a un tratamiento con AAB incrementando el potencial osmótico en el protoplasto, pero ello no se traduce en el cierre del poro estomático.

En suma, el estrés hídrico debido a las pérdidas de agua por transpiración y a las posibles alteraciones del funcionamiento del sistema radical, es la causa que produce más pérdidas en el proceso de adaptación de plantas cultivadas "in vitro" a condiciones de invernadero. Por ello, en esta fase se deben situar las plantas en una atmósfera con una humedad relativa máxima durante un período de una a tres semanas a 15-25°C cuidando que en estas condiciones, no se desarrollen enfermedades de tipo fúngico.

Dado el comportamiento distinto al cultivo in vitro de las diferentes variedades de mandioca (Raemakers et al., 1993; Bhaywat et al., 1996) y la necesidad de disponer de material suficiente para la realización de los experimentos que componen este trabajo, se estudia en este primer capítulo la respuesta de los clones SOM-1, 50 y 05 a la micropropagación. Para ello, se considera la influencia de los reguladores de crecimiento en el desarrollo in vitro y la aclimatación de las plantas obtenidas de cada uno de ellos.

IV.2. MATERIALES Y METODOS

Respecto a la acción de reguladores en el medio de cultivo, se realizaron dos grupos de experimentos, aquéllos que tenían por objeto conocer la influencia del ANA en la formación de raíces y los que pretendían incrementar el factor de multiplicación por formación de brotes laterales, más dependientes de la acción de las citoquininas.

Por otro lado, se hizo otro grupo de experimentos, con la finalidad de estudiar el efecto que sobre la micropropagación posterior tiene la posición de la yema en la planta de partida.

Como material vegetal, para todas las pruebas, se usaron los clones de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz):

- Clon "SOM-1", procedente de Somalia y facilitado por el Prof. P. Fiorino de la Universidad de Florencia (Italia).
- Clon "05", con número de identificación 7902, originario de Costa de Marfil y donado por IDESSA (Institut Des Savannes).
- Clon "50", con identificación Bonova rouge 1, con origen en Costa de Marfil (IRAT Mouaké).

Los dos últimos clones fueron facilitados por el "Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération", L'ORSTOM de Montpellier (Francia). En todos los casos, el material se recibió en frascos de cultivo in vitro en medio controlado, dada la dificultad inicial de obtenerlo por su carácter tropical y por la mayor facilidad de transporte.

En la primera prueba con reguladores de crecimiento, se comparó el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento, con el mismo medio y adición de $0,13 \text{ mg l}^{-1}$ de ANA (tabla 1). En ambos casos con adición de 30 g l^{-1} de sacarosa y 100 mg l^{-1} de mioinositol gelificado con 6 g l^{-1} de agar y a pH de 5,7. Se emplearon 50 explantos de aproximadamente 1 cm de longitud y con una sola yema por clon (3), en cada uno de los medios citados (2), con dos repeticiones (2) lo que dio un total de 600 explantos en el experimento.

Los explantos, que no se esterilizaron por provenir de cultivo in vitro, se sembraron individualmente en tubos de ensayo (150 x 24) con 10 ml de medio. Cada tubo se tapó con un tapón de polipropileno y se selló con parafilm. Los tubos se depositaron en una cámara de cultivo con las siguientes condiciones de incubación: 16 horas de luz por día, con iluminación de $30 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y 25°C de temperatura. A los 35 días de cultivo in vitro, se determinó la longitud del tallo formado, el número de yemas por planta, el número de raíces y la longitud de las mismas.

En la segunda prueba con reguladores de crecimiento, se pretendió mejorar el factor de multiplicación. El tipo de material vegetal, y las condiciones de cultivo e incubación, fueron iguales a las del primer experimento salvo en la adición de reguladores de crecimiento del medio. En este segundo caso, se ensayaron concentraciones respectivas de 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg l^{-1} de BA y de kinetina por separado. Se realizaron en total 8 tratamientos mas el control, en cada uno de los 3 clones, con 12 explantos por tratamiento con 2 repeticiones. En consecuencia, se usaron en total 576 explantos. A los 35 días de cultivo in vitro se midió la longitud del tallo, el número de yemas y ramificaciones y número de raíces.

Dado que el material procedente de condiciones "in vitro", tiene una gran facilidad de deshidratación en los momentos iniciales de su adaptación al medio convencional de crecimiento, para el trasplante a condiciones externas, se usó el método propuesto por Cantos et al., (1993). Así, el conjunto formado por la maceta y la planta de mandioca se cubrió con una bolsa de polietileno transparente pulverizada con agua. A continuación las

macetas se colocaron en una cámara de crecimiento con humedad relativa del 60% y fotoperíodo de 16 horas de luz/día. La iluminación fue de $111 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$, obtenida mediante dos tipos diferentes de lámparas (ELVA 250 w, 220-230 v y HQI-T 400w/DH (OSRAM)) para abarcar la mayor gama posible de longitudes de onda a fin de obtener una óptima función fotosintética.

Los datos estuvieron sujetos a análisis de la varianza (ANOVA) empleando el test L.S.D para la separación de medias y la relación entre variables se realizó mediante el coeficiente de correlación lineal (r) de Pearson empleando el programa STATGRAF 6.0. En el estudio de supervivencia se empleó el test-T para diferencias de proporciones mediante un programa realizado en BASIC por este departamento.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.3.1. Influencia de la presencia de auxina (ANA) en el medio sobre la radicación y el desarrollo del explanto de mandioca in vitro.

IV.3.1.1. Tanto por ciento de radicación.

En todos los clones, tanto en medio con como sin ANA, el número de explantos radicados fue muy elevado, próximo al 100% sin diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Es decir, los explantos de las variedades de mandioca utilizados mostraron una gran facilidad para enraizar sin necesitar de la presencia de auxina en el medio. Este comportamiento no coincide con lo que indica la bibliografía, donde en la mayor parte de los casos se utilizan dos fases en el proceso de propagación de la mandioca, la de crecimiento sin auxina en el medio, y la de enraizamiento con ANA. (Roca, 1980; Konan et al., 1997; Mussio et al., 1998).

IV.3.1.2. Número de raíces por planta.

En este caso, al contrario de los indicado antes, la auxina favoreció la formación de un mayor número de raíces por planta en todos los clones considerados (tabla 1), lo que está de acuerdo con los efectos descritos por Heloir et al., (1997) para el cultivar Pinot noir de *vid* (*Vitis vinifera* L), por Taylor y Van Standen (1998) para tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y Nair et al., (1979) para mandioca (*Manihot esculenta* Cranz).

Referente al comportamiento de los clones, se observa en la misma tabla, que las plantas del clon SOM-1 desarrollaron, de forma significativa, un mayor número de raíces que las de los dos restantes, tanto en el medio con como sin ANA. Los clones 05 y 50, no presentaron diferencias entre sí en ninguno de los medios ensayados.

IV.3.1.3. Longitud media de raíces.

Los explantos de cada clon, cultivados en el medio sin ANA, formaron raíces mas largas que aquellos mantenidos en presencia de la auxina (tabla 1). Es decir, que existió una relación inversa entre el número de raíces, favorecido por la presencia de ANA en el medio, y la longitud de éstas, mayor en el medio sin ANA. Este mismo hecho se produjo al comparar los clones entre sí. Las raíces del clon 05, el que había formado menor número de éstas, fueron las mas largas. Aunque sin diferencias estadísticamente significativas, también las raíces del clon 50, menos numerosas fueron mayores que las del clon SOM-1. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Heloir et al., (1997) para el cultivar Pinot noir de vid.

IV.3.1.4 Longitud del tallo.

Aunque sólo se produjo diferencia estadísticamente significativa en el caso del clon 50, las plantas cultivadas en presencia de ANA en el medio, tuvieron un ligero mayor crecimiento del tallo (tabla 1).

IV.3.1.5. Número de yemas.

En cuanto al número medio de yemas, inducido en medio con y sin auxina, (tabla 1), no existieron diferencias en el caso de las plantas de los clones SOM-1 y 05. Las del clon 50, con 3,54 yemas por planta con presencia de ANA en el medio, fue superior estadísticamente a la media, 2.84 obtenida en ausencia de dicha auxina.

Como resumen de este capítulo de influencia del ANA en la propagación in vitro de explantos de mandioca, se observó un comportamiento parecido de los tres clones ensayados. Todos ellos respondieron muy bien a este tipo de propagación en condiciones controladas, utilizando medio MS suplementado con 87,6 mM de sacarosa y 1,11 mM de inositol, tanto con ANA como sin ANA incluso sin adición de citoquininas al medio. Esto

Tabla 1. Longitud y número medio de raíces, longitud del tallo y número medio de yemas de plantas de mandioca desarrolladas en presencia y ausencia de ANA en el medio de cultivo.

CLON	Raíz						Tallo													
	Longitud (mm)			Número			Longitud (mm)			Número de yemas										
	sin ANA		con ANA	sin ANA		con ANA	sin ANA		con ANA	sin ANA		con ANA								
SOM-1	52,9	b	28,0	b	*	4,7	a	6,6	a	*	37,3	ab	41,0	b	ns	3,1	a	2,9	a	ns
05	66,4	a	39,2	a	*	3,1	b	5,0	b	*	42,2	a	43,4	ab	ns	2,8	a	2,4	a	ns
50	52,9	b	29,7	b	*	3,3	b	5,7	b	*	31,7	b	49,3	a	*	2,8	a	3,5	a	*

Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$), respecto a tratamientos con y sin ANA. Letras diferentes leídas en columna indican diferencias significativas entre clones ($P < 0,05$). Test LSD.

se demostró por el buen desarrollo del tallo, tanto en longitud como en número de yemas, así como por el alto porcentaje de emisión radicular. No obstante, la presencia de ANA en el medio permitió la formación de mayor número de raíces aunque mas cortas, que cuando no se añadió la auxina al medio de cultivo.

Entre los clones, las plantas de SOM-1 mostraron la mejor predisposición para el desarrollo del sistema radicular, ya que, tanto en presencia como en ausencia de ANA, produjeron en cada caso el número mas alto de raíces, aunque también mas pequeñas que en los casos en que se formó menor número de ellas. Es decir, se encontró una relación inversa entre el número de raíces y la longitud de las mismas. En cualquier caso, existió una radicación y un crecimiento de raíces y de tallo aceptables en el primer medio de cultivo, tanto con ANA como sin ANA. Este hecho, que se indica por primera vez, ya que en la bibliografía siempre se destaca la necesidad de emplear dos medios de cultivo (crecimiento y enraizamiento), facilitó mucho la propagación in vitro de la mandioca al evitar el segundo subcultivo.

IV.3.2. Influencia de la citoquinina en el desarrollo in vitro del explanto de mandioca.

En la tabla 2 se indican los resultados que definen la influencia de la presencia de BA o de kinetina en el medio, sobre el desarrollo in vitro del explanto de mandioca. Dentro de sus niveles respectivos, todos los clones demostraron un comportamiento similar en cada caso, por lo que los datos se dan como media de los tres. La longitud del tallo de las plantas control, fue significativamente superior a la de aquéllas que crecieron en cualquiera de los tipos o concentraciones de citoquinina utilizadas. En el caso de los tratamientos con

BA la disminución del crecimiento del tallo, fue inversa a la concentración usada, ($r=-0,890$) mientras que la presencia de kinetina provocó una bajada importante del crecimiento desde la concentración mas baja, sin que concentraciones superiores mostraran mayor influencia. Por el contrario, la proliferación de brotes laterales aumentó con la presencia en el medio de citoquininas, en especial con BA, en relación directa a la concentración del compuesto ($r=0,973$ para BA y $r=0,814$ para kinetina). No obstante, la brotación lateral obtenida no aportó una clara mejora al factor de multiplicación, ya que, como media, en ningún caso se alcanzó un ramo lateral por planta, lo que indicó que algunas plantas no formaron ramificación y otras sólo lograron un ramo lateral. En relación con la mayor tendencia a formar brotes, el tratamiento con BA, incrementó, en general, el número de yemas neoformadas.

Tabla 2. Influencia de BA y kinetina sobre el desarrollo del explanto de mandioca tras 35 días de cultivo "in vitro" (media de los 3 clones).

Parámetro	Concentración de BA en el medio					Concentración de kinetina en el medio				
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Longitud (mm)	8,04 a	4,60 b	3,28 b	2,97 b	2,59 b	8,04 a	2,3 b	2,45 b	2,44 b	2,68 b
Nº ramos	0,00 b	0,00 b	0,35 ab	0,57 ab	0,85 a	0,00 a	0,20 a	0,26 a	0,26 a	0,26 a
Nº yemas	4,01 a	4,77 a	6,03 a	5,37 a	7,10 a	4,01 a	4,27 a	4,03 a	4,27 a	4,64 a
Nº raíces	6,05 a	4,07 a	5,78 a	3,00 a	2,25 a	6,05 a	4,53 a	2,92 a	2,44 a	3,38 a

Letras diferentes leídas en fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$), respecto a tratamientos con BA o con kinetina. Test LSD.

El tratamiento con kinetina, no modificó el número de yemas obtenidas en las plantas control. Como es conocido, ambos tratamientos de citoquininas disminuyeron el número de raíces en relación inversa a la concentración usada ($r=-0,820$ para BA y $r=-0,811$ para kinetina).

En consecuencia, la presencia de citoquinina en el medio, disminuyó notablemente el crecimiento del tallo, favoreció ligeramente la proliferación de yemas y brotes laterales y sin significación estadística disminuyó la formación de raíces. Por ello, para las condiciones de estas pruebas, no se encontró ventaja alguna en la adición de citoquinina al medio de cultivo.

IV.3.3. Prueba de adaptación a condiciones "in vivo".

Se consideró de interés controlar si los distintos tipos de sistemas radicales provocados, en especial, por la presencia de ANA en el medio tuvieron alguna influencia sobre la supervivencia y el desarrollo de la planta de mandioca al ser trasplantada a condiciones externas.

En la tabla 3 se indica la evolución, durante los primeros 100 días, del porcentaje de plantas de mandioca adaptadas a condiciones normales de crecimiento. En dicha tabla se especifica el comportamiento de los tres clones en estudio, dependiendo de que las plantas adaptadas hubiesen sido previamente obtenidas in vitro en presencia o ausencia de ANA.

Tabla 3. Evolución del tanto por ciento de plantas supervivientes al trasplante en la fase de adaptación.

Clon	Días desde el trasplante	% plantas supervivientes									
		0		25		50		75		100	
SOM-1	con ANA	100	a	93,8	a	55,1	b	55,1	b	55,1	b
	sin ANA	100	a	87,5	ab	60,0	b	57,5	b	57,5	b
05	con ANA	100	a	80,0	b	62,2	b	62,2	b	62,2	b
	sin ANA	100	a	78,2	b	65,2	b	65,2	b	65,2	b
50	con ANA	100	a	78,2	b	65,2	b	65,2	b	65,2	b
	sin ANA	100	a	84,4	b	82,2	b	82,2	b	82,2	b

Letras diferentes leídas en fila indican diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto a tratamientos con ANA. Test LSD.

En todos los casos, la mayor parte de las pérdidas se produjeron durante los primeros 50 días como sucede en la mayoría de las plantas, tanto de mandioca (Roca 1984; Guoha M. , 1998) como de otras especies como vid (Cantos et al., 1993), olivo (Pérez, 1997), Prunus (Zacchini y Morini, 1998) ó gardenia (Serret et al., 1997). Ese tiempo comprende un primer período de adaptación in vitro-ex vitro en el que ni el sistema radicular, ni la regulación estomática foliar (Choudhury y Monteith, 1986; Zacchini y Morini, 1998) están bien regulados con las necesidades de la planta, lo que puede producir pérdidas irreversibles de agua en los tejidos. También se produjeron nuevas pérdidas en los primeros días de haber pasado las plantas de la cámara de cultivo a invernadero.

No se observaron diferencias de adaptación entre las plantas con raíces formadas en medio sin ANA (largas aunque menos numerosas) o con ANA (menores y mas numerosas) como lo confirma los coeficientes de correlación entre plantas adaptadas y tiempo ($r=-0,887$ para plantas con raíz inducida y $r=-0,876$ para las de raíz espontánea), y la comparación entre las medias de plantas convenientemente aclimatadas procedentes de ambas situaciones . Tampoco se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de plantas adaptadas al exterior de los clones en estudio.

En la tabla 4 se indican los valores medios de longitud del tallo y del número de brotes de las plantas adaptadas en la prueba descrita, para cada uno de los tres clones en estudio, a los 50 días desde su trasplante al exterior. En dicha tabla, se observa que no existieron diferencias significativas entre la longitud del tallo de las plantas de los clones SOM-1 y 05, con raíz inducida o espontánea. Sólo las plantas del clon 50, que crecieron más que las de los otros dos clones, tuvieron tallos algo mayores cuando su sistema radicular se había formado en medio con ANA. Tampoco existieron diferencias entre el número de brotes de las plantas con raíces inducidas y espontáneas y que las plantas del clon 50 presentaron un mayor número de brotes que de los otros dos clones, entre los que no existieron diferencias significativas.

Por otra parte, tampoco se encontraron diferencias en la supervivencia al trasplante in vitro-ex vitro (74%), ni entre el desarrollo durante la fase de aclimatación de las plantas de la prueba de adición de citoquininas (kinetina o BA) al medio de cultivo in vitro.

Del conjunto de los resultados se puede destacar que con el método de cultivo in vitro utilizado se logró de un solo cultivo, el desarrollo contemporáneo de la parte aérea (tallo, hojas) y del sistema radicular, del explanto de mandioca cultivado in vitro.

Tabla 4. Longitud media y número medio de brotes de plantas de mandioca adaptadas a condiciones “ex vitro” en relación al tipo de raíz.

CLON	Tallo									
	Longitud (mm)					Número de yemas				
	sin ANA		con ANA			sin ANA		con ANA		
SOM-1	50,0	b	48,6	c	ns	4,0	b	4,0	a	ns
05	60,2	a	66,2	b	ns	3,7	b	3,9	a	ns
50	72,6	a	94,7	a	*	4,3	a	4,6	a	ns

Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$), respecto a tratamientos con y sin ANA. Letras diferentes leídas en columna indican diferencias significativas entre clones ($P < 0,05$). Test LSD.

Este hecho se considera de interés, ya que produce un notable ahorro de tiempo y dinero, puesto que el cultivo in vitro de material de mandioca, se realiza tradicionalmente en dos fases (un primer subcultivo para favorecer el crecimiento aéreo y un segundo para la radicación). No se encontró ningún efecto significativo positivo sobre el desarrollo in vitro del explanto de mandioca, por la adición al medio de cultivo de ANA a las concentraciones de 0,13 mg l⁻¹, o de BA o kinetina a las concentraciones 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 mg l⁻¹. Solamente la presencia de ANA en el medio, provocó un mayor número de raíces por planta, pero estas fueron de menor tamaño que las menos numerosas obtenidas en el medio sin la auxina. No obstante, este mayor número de raíces no influyó en el desarrollo de la planta in vitro. Cuando se utilizó la técnica propuesta por Cantos et al., (1993), se alcanzó aproximadamente un 70% de plantas supervivientes tras el trasplante in vitro-ex vitro y un crecimiento normal de las mismas. Tampoco en este caso, las plantas que se habían cultivado in vitro en medio con reguladores de crecimiento (auxina o citoquinina), mostraron un comportamiento distinto a las que no tuvieron dichas sustancias en el medio. Es decir, que para las condiciones de los experimentos que aquí se indican no fue aconsejable el uso de reguladores de crecimiento en la propagación in vitro de los explantos de mandioca.

En consecuencia, a partir del escaso material inicial (1-2 explantos in vitro de cada clon) utilizando la técnica de propagación in vitro sobre medio de Murashige Skoog con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 100 mg l⁻¹ de inositol, sin reguladores de crecimiento se logró un elevado coeficiente de multiplicación y plantas completas en un solo cultivo. Posteriormente, utilizando la técnica descrita por Cantos et al., (1993), se obtuvieron resultados excepcionales en el trasplante in vitro-ex vitro, lográndose plantas de gran calidad en condiciones de invernadero, que permitieron la realización de los experimentos que se discuten a continuación.

V. INFLUENCIA DE LA SALINIDAD (NaCl) EN EL DESARROLLO DE PLANTAS DE MANDIOCA (*Manihot esculenta* Cranz) IN VITRO.

V.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo in vitro de tejidos y células vegetales es una herramienta útil para estudios relacionados con la salinidad, en especial para la caracterización de líneas tolerantes, ya sean mutantes espontáneos o inducidos (Sumaryati et al., 1992; Kuo et al., 1994; Morabito et al., 1994; Hafizur-Rahman et al., 1995; Zhang y Donnelly, 1997; Cano et al., 1998; Kirdmanee et al., 1998; Khrais et al., 1998; Liua y Baob, 1998; Ochatt et al., 1999).

Sin embargo, a diferencia de los numerosos trabajos sobre la tolerancia de plantas a la salinidad realizados en condiciones de campo o de invernadero, hay muy pocos estudios en los que se aplica el cultivo de tejidos in vitro a la selección de plantas tolerantes a la sal. Debido a la importancia que presenta la salinización, junto a la dificultad de alcanzar resultados prácticos en la selección convencional, y a la facilidad de aplicación de estrés salino a cualquier sistema in vitro, es interesante potenciar estos estudios (Cano, 1991). No obstante, de acuerdo con Skene y Barlass (1988) y Troncoso et al., (1999a), los resultados obtenidos in vitro deben ser contrastados en experimentos realizados en condiciones externas.

Una de las primeras investigaciones sobre el efecto de la sal en material vegetal cultivado in vitro, fue realizado por Babaeva et al., (1968) utilizando callos de raíz de zanahoria (*Daucus carota* L.), cultivados en concentraciones crecientes de NaCl. De este modo, se observaron diferentes niveles de tolerancia a la salinidad según el material obtenido.

Melchers (1972), discutió las ventajas de la técnica de cultivo de tejidos in vitro para seleccionar mutantes resistentes a la sal. Esta aproximación, la aplicó posteriormente con éxito Zenk (1974), que seleccionó una línea celular aislada de haploides de *Nicotiana sylvestris* L., capaz de crecer sobre medio conteniendo 0,17 mM de NaCl, resistencia que se mantuvo estable después de varios subcultivos en medio salino.

Otro avance fué el conseguido por Dix y Street (1975), que seleccionaron un número de líneas celulares de *Nicotiana sylvestris* L. y *Capsicum annuum* L., capaces de desarrollarse en medio líquido con 0,34 M de NaCl. Algunas de estas líneas retuvieron la tolerancia a la sal después de varios subcultivos en medio sin NaCl. Nabors et al., (1980), describieron la heredabilidad de la tolerancia a la sal en plantas seleccionadas de *Nicotiana tabacum* L. regeneradas a partir de células de NaCl-tolerantes, encontrando que el nivel de resistencia de la progenie de las plantas regeneradas fue mayor que el de las plantas originales.

Goldner et al., (1977), clasificaron las posibles mutaciones seleccionadas para la tolerancia a estrés salino mediante cultivo de tejidos in vitro, en tres grandes grupos : 1) mutaciones resistentes a estrés osmótico; 2) mutaciones resistentes a estrés causados por altas concentraciones de sales totales y 3) mutaciones resistentes a estrés causado por iones específicos. Además, recomendaron procedimientos específicos para cada uno de estos grupos y sugirieron que la técnica de selección usada por Zenk (1974), Dix y Street (1975) y Nabors et al., (1975) para cultivos de células en suspensión en NaCl, es aplicable a la selección de mutantes en el primer grupo. Así mismo, llegaron a emplear el cultivo de tejidos in vitro para estimar las contribuciones relativas de los diferentes efectos de los daños causados por la sal. Para ello, compararon los efectos del agua de mar, soluciones de diferentes sales inorgánicas y manitol sobre el crecimiento y la coloración de callos diploides, originados a partir de raíces de zanahoria (*Daucus carota* L). De los resultados obtenidos, concluyeron que la inhibición del crecimiento se debía fundamentalmente al incremento de presión osmótica, mientras que la decoloración y la necrosis eran atribuibles a la toxicidad de la sal. Chen et al., (1980), trabajando con callos de *Nicotiana tabacum* L. en medio conteniendo varias concentraciones de agua de mar o NaCl, encontraron que una solución de un solo tipo de sal (NaCl) resultó ser más tóxica para los tejidos que el agua de mar a la misma concentración.

Strogonov (1973), estudió la respuesta a NaCl de callos obtenidos a partir de cuatro especies glicófitas y una halófito. Mientras la respuesta de callos originados a partir de especies glicófitas estuvo relacionada con la respuesta de la planta completa a la salinidad, esta correlación no existió en la halófito siendo el callo originado a partir de esta última mucho más sensible que los de la más sensible a la sal de las glicófitas.

Estos resultados fueron confirmados en dos glicofitas (*Phaseolus vulgaris* L. y *Beta vulgaris* L.) por Smith y McComb (1981), no siguiendo este patrón las halofitas *Atriplex undulata* L. y *Suaeda australis* L. Por tanto, los investigadores citados

concluyeron que, en contraste con las glicófitas, la resistencia a la sal en las especies halófitas depende de la integridad anatómica y fisiológica de la planta completa y no de las propiedades celulares. En consecuencia, las células de estas plantas no son capaces de resistir la sal cuando se encuentran en forma de callo.

Por el contrario, otros autores encontraron una correlación entre la respuesta de la planta completa y el callo derivado de la misma, tanto en glicofitas como en halofitas. Así, Von Edeströn y Breckle (1974), descubrieron esta correlación en *Suaeda maritima* L., incluso el callo creció mejor en medio con sal que en el carente de ella. Tal et al., (1978), establecieron que las células que se originaron de hojas, tallos y raíces de tomate cultivado y de dos especies salvajes tolerantes a la sal (*Lycopersicon peruvianum* L. y *Solanum pennellii* Corr.) mejoraban en proporción similar cuando la planta completa se cultivó en salinidad. Concluyeron que el mejor ajuste osmótico, que caracterizaba a las especies silvestres bajo alta salinidad, es operativo a nivel celular y no depende de la organización de esas células en la planta completa. Un comportamiento similar observó Orton (1980) para callos procedentes de plantas sensibles y resistentes de cebada (*Hordeum vulgare* L.). Un intento de uso de líneas celulares resistentes a NaCl de *Nicotiana sylvestris* L. para conocer la base de la resistencia a alta salinidad, fue publicado por Dix (1980), usando microanálisis con rayos X. Sugirió que la acumulación o secuestro de iones Na^+ y Cl^- en un compartimento subcelular no puede ser el mecanismo responsable de la tolerancia a la sal en estos cultivos celulares.

Por otro lado, uno de los principales problemas del uso del cultivo in vitro como herramienta de selección de plantas tolerantes a la sal es que la planta regenerada a partir de células vegetales no implica garantía absoluta de que sea una copia exacta de la línea parental utilizada, de modo que no siempre la tolerancia en el ámbito celular ha sido expresada en la planta regenerada. (Tal, 1985; Flowers et al., 1985). Esto es debido a la variación somaclonal (Scowcroft y Larkin, 1982) que es una manera de aumentar la variabilidad genética, dando lugar a un cambio genético (características cualitativas y cuantitativas) que se puede mantener en las plantas regeneradas (Cano, 1991). El valor de la variación somaclonal en agricultura ha sido descrito adecuadamente por Ahloowalia (1978) Larkin y Scowcroft (1981) y Evans et al., (1982). Por ello, durante las primeras etapas de selección in vitro para tolerancia a la salinidad, el interés se centra en comprobar si la variación está expresada fielmente en los cultivos de células y de tejidos. Esto se ha comprobado en callos de *Hordeum jubatum* L. (Orton, 1980); *Lycopersicon peruvianum* y *L. pennellii* Corr. (Tal et al., 1978). *L. esculentum*, *L.*

pennellii y su híbrido interespecífico (Pérez-Alfocea, 1991), *Beta vulgaris* (Smith y Mc Comb, 1981a) y *Medicago sativa* (Smith y McComb, 1981b) y en suspensiones celulares de las plantas halófitas *Salicornia* y *Suaeda maritima* (Von Edeströn y Breckle, 1974), *Distichlis spicala* (Warren y Gould, 1982) y *Spartina peclinala* (Warren et al., 1985).

Los estudios sobre cultivo in vitro de tejidos usando material más diferenciado y, en consecuencia menos susceptible a ser modificado genéticamente que las células o callos, para la selección de clones tolerantes a la sal son todavía más escasos. Uno de los primeros trabajos, efectuado con yemas, fue realizado por Barlass y Skene en 1981 con vid (*Vitis vinifera* L.), encontrando que la tolerancia in vitro al NaCl es dependiente de la variedad y está relacionada con la acumulación de Cl⁻ en los tejidos del explanto. Aunque constataron que la metodología era aplicable a la selección, en trabajos posteriores Skene y Barlass, (1988) observaron que la selección in vitro de material de vid por su tolerancia a la salinidad necesitaba ser contrastada con ensayos realizados en condiciones externas. Posteriormente, (Troncoso et al., 1999a), estudiaron la respuesta de once portainjertos de vid a concentraciones crecientes de NaCl en el medio de cultivo, tanto in vitro usando yemas apicales y axilares como en cámara de crecimiento. Los resultados obtenidos permitieron clasificar las variedades estudiadas de acuerdo con su tolerancia a la salinidad en medio controlado y confirmar dicho comportamiento en condiciones externas. Alhagdown et al., (1999) consideraron las interacciones de la sal con el estado nutritivo de plantas de patata obtenidas por micropropagación y Cano et al., (1998) evaluaron la tolerancia a sal de diferentes especies de tomate silvestre, resaltando que los parámetros de enraizamiento de las plántulas desarrolladas a partir de los ápices pueden ser buenos indicadores para una evaluación rápida de la tolerancia a la sal.

El objetivo del presente capítulo es estudiar la tolerancia a la sal cultivando in vitro yemas subapicales en medio con concentraciones crecientes de NaCl de los tres clones de mandioca descritos.

V.2. MATERIALES Y MÉTODOS

En todos los casos, como material vegetal se emplearon explantos de aproximadamente un centímetro de longitud, con una yema axilar, obtenidos de plantas mantenidas in vitro, de los clones SOM-1, 05 y 50 usados en las pruebas anteriores.

Dado que los explantos provenían de plantas conservadas in vitro y en su preparación se trabajó en condiciones de asepsia, no fue necesario desinfectarlos.

Como medio de cultivo se utilizó el de Murashige y Skoog (1962) con 30 g l⁻¹ de sacarosa y 100 mg l⁻¹ de mioinositol. El pH se ajustó a 5,7 con NaOH y HCl 1N y se añadió agar-agar (Cultimed) al 0,5%. Los distintos medios salinizados se prepararon por adición al medio anterior (control) de soluciones de NaCl respectivamente de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 g l⁻¹ que dieron una conductividad eléctrica de 4.6, 7.5, 10.63, 13.5, 16.4 y 19.2 dS m⁻¹ en la primera prueba, y de 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 g l⁻¹ de NaCl en las que se midió una conductividad eléctrica de 4.6, 5.3, 6.1, 6.8, 7.5, 8.3 y 9.1 dS m⁻¹ en la segunda prueba. La esterilización de estos medios y del material de laboratorio, se realizó en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión durante 20 minutos.

En el primer y segundo experimento, se emplearon 48 explantos por clon (3 clones) y tratamiento salino (6 concentraciones salinas) lo que dio un total de 864 explantos en cada prueba. En todos los casos, los explantos se sembraron individualmente en tubos de ensayo de 150 x 25 mm, con 8 ml de medio. Cada tubo se tapó con un capuchón de polipropileno cuyo borde se selló con parafilm y se puso en una cámara de cultivo a 25±2 °C, 16 horas de fotoperiodo y 30 µE m⁻² s⁻¹ de intensidad luminosa. Transcurridos 80 días se analizó la supervivencia de las plantas. En la segunda prueba se consideró además la producción de biomasa (peso fresco y peso seco), el grado de hidratación de los tejidos según la formula; {(Pf-Ps)/Pf}.100; la longitud del tallo, el número de yemas, el número de hojas y la superficie foliar, el número de raíces y la composición mineral de raíz, tallo y hojas de las plantas supervivientes.

La producción de biomasa se determinó separando las plantas extraídas de cada tubo en raíz, tallo y hojas, y pesando cada una de estas partes. Para la determinación del peso seco se puso cada órgano en estufa de aire forzado a 70°C hasta peso constante. La superficie foliar se determinó mediante digitalización de imagen (Leaf Area Meter Skye).

V.2.1. Determinaciones analíticas.

Cada muestra se lavó con agua y detergente y se enjuagó cuidadosamente con agua destilada. Para su desecación, se envolvió en un papel de filtro y se introdujo en

una estufa con circulación de aire a 60 °C, durante 2 ó 3 días. Una vez seca se molió en un molinillo y el polvo se introdujo en un sobre de papel debidamente etiquetado.

Para la determinación de los elementos sodio, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, manganeso y cinc se utilizaron técnicas de espectrofotometría de absorción atómica, por medio de un espectrómetro Perkin-Elmer mod. 300 (C.I.I.T.D.F., 1960). El procedimiento consistió en pesar 0.5 gramos (si no hubo suficiente muestra se pesaron 0.25 gramos) de cada muestra de polvo vegetal que se pusieron en cápsulas de platino, y se introdujeron en un horno frío, elevando la temperatura paulatinamente hasta 500 °C, en 2 ó 3 horas. Una vez calcinadas, se humedecieron con 2-3 ml de agua desionizada más 1ml de HCl concentrado, añadidos lentamente. A continuación, se calentaron sobre unas placas hasta la aparición de los primeros vapores. Cada muestra resultante se filtró arrastrando el polvo de la cápsula con agua desionizada, recogiendo el filtrado sobre un matraz aforado de 50 ml (si se pesaron 0.5 g) o de 25 ml (si se pesaron 0.25 g), y se enrasó con agua desionizada. Luego, tras agitación, se midieron mediante absorción atómica.

El procedimiento para la determinación de nitrógeno consistió en pesar 0.2 g de cada muestra vegetal e introducirlos en tubos de vidrio Kjeldahl. Se les añadieron 0.5 g de K_2SO_4 desecado y selenio (catalizadores de digestión), y 5 ml de H_2SO_4 . Los tubos se colocaron en un bloque digestor y se sometieron a una digestión elevando la temperatura hasta 380 °C.

Después del ataque se les añadió agua destilada y cuando se enfriaron se pasaron a matraces de 25 ml y se enrasaron. Así, las muestras quedaron preparadas para leerlas en el autoanalizador frente a una curva patrón.

El fósforo se determinó por colorimetría, tras la formación del complejo fosfato-vanadato-molibdato.

El análisis de cloro se realizó por medio de una calcinación en medio básico para evitar pérdidas de cloruros. La muestra de cenizas se extrajo con agua caliente y el cloro del extracto se determinó colorimétricamente con el método del tiocianato de mercurio en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda EZ210. El procedimiento consistió en pesar 1g de muestra de polvo vegetal en cápsula de porcelana. Se mezcló la muestra con la cuarta parte de su peso de óxido de calcio y suficiente agua sobre placa caliente. Se calcinó en horno a 500 °C durante 90 minutos y se dejó enfriar. Se añadieron unos 10 ml de agua caliente y se colocó unos minutos sobre placa caliente. Se agitó cuidadosamente

con varilla de vidrio y se filtró sobre matraz de 100 ml. El residuo se lavó unas cinco veces con 10 ml de agua caliente, se enfrió y llevó a volumen.

La colorimetría se realizó pipeteando una alícuota que contenía menos de 50 mg de cloruro a un matraz aforado de 25 ml. Se añadieron 2 ml de reactivo nitrato férrico y 2 ml de tiocianato de mercurio, se agitó y llevó a volumen.

Se midió la absorbancia frente al punto 0 de la curva de calibrado a 460 nm, después de 5 minutos. Se preparó una curva de calibrado pipeteando en matraz de 25 ml que desarrolló el color como se describe anteriormente.

Los datos estuvieron sometidos a un análisis de la varianza multifactorial (MANOVA) siendo los factores, clon y salinidad, y se empleó el test de rango múltiple de Duncan para la separación de medias. En este análisis de datos se utilizó el programa SPSS bajo Windows 10.0. En el estudio de supervivencia se empleó el test-T para diferencias de proporciones mediante un programa realizado en BASIC por este departamento.

La relación entre las variables peso fresco y peso seco de las plantas y la salinidad se realizó mediante el ajuste por mínimos cuadrados a la función de tipo exponencial propuesta por Van Genuchten (1983) siguiente:

$$Y_r = e^{C(\alpha - \beta C)}$$

donde Y_r es la biomasa relativa ($1/1$), C es la concentración salina y α y β son constantes.

Con los resultados se realizó una prueba χ^2 de bondad de ajuste y determinación del coeficiente de correlación lineal (r) de Pearson.

V.3. RESULTADOS

V.3.1. Influencia de la salinidad sobre la supervivencia del explanto.

En la tabla 5 se indica el número y el tanto por ciento de plantas obtenidas a partir de explantos en el ensayo donde se aplicaron al medio de cultivo concentraciones de sal, de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 g l⁻¹.

Se observa, que cuando no se añadió sal al medio, vivieron todos los explantos y llegaron a formar plantas. Este comportamiento indicó, de nuevo, la buena disposición del explanto de mandioca para ser propagado in vitro y dio garantías de que las bajas

que se produjeran al añadir NaCl al medio, se podían asociar a la acción negativa de la salinidad.

Tabla 5. Efecto de la salinidad sobre la supervivencia de explantos de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50 después de 80 días de cultivo in vitro (primer ensayo).

Clon	Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)											
	0		2		4		6		8		10	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
SOM	48	(100) a	34	(71) a	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
05	48	(100) a	30	(62) a	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
50	48	(100) a	40	(83) a	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)

Test T-student para diferencias de proporciones. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) en mayúscula para los tratamientos salinos y en minúscula para los clones.

En el medio con 2 gl⁻¹ de NaCl, descendió el número de explantos supervivientes en los tres clones de mandioca considerados con respecto al control, siendo el clon 05 el que tuvo mayores pérdidas, aunque sin significación estadística. Es decir, la sal comenzó a mostrar su efecto perjudicial sobre el material vegetal a una concentración salina de 2 gl⁻¹, pero todavía de forma poco intensa. A partir de la concentración de 4 gl⁻¹ de NaCl en el medio, se produjo la muerte de todos los explantos sembrados in vitro. Esto es, no pudieron soportar dicha concentración salina. De los resultados obtenidos se deduce que el límite de tolerancia a la presencia de sal en el medio, del explanto de los tres clones de mandioca considerados, debería estar comprendido entre 2 y 4 gl⁻¹ de NaCl.

En consecuencia, al objeto de fijar mejor el límite de tolerancia a la sal del material de mandioca in vitro, se planteó una nueva prueba donde los niveles salinos fueron desde 0 hasta 3 gl⁻¹ con incrementos de NaCl en cada tratamiento de 0.5 gl⁻¹. Los resultados de supervivencia se muestran en la tabla 6.

Se observa en dicha tabla, que las primeras bajas se produjeron en las plantas de clones 05 y 50 al añadir al medio 1.5 gl⁻¹ de NaCl, pero no en el clon SOM-1. Con la adición de 2 gl⁻¹ de NaCl, volvió a disminuir el número de explantos vivos en los tres clones y en este caso, el descenso fue también significativo para el clon SOM-1.

Al añadir al medio 2,5 gl⁻¹, se observó un cambio espectacular, ya que el número de explantos muertos aumentó significativamente en relación con los tratamientos anteriores y en especial alcanzó el 85% en el clon 05.

Tabla 6. Efecto de la salinidad sobre la supervivencia de explantos de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50 después de 80 días de cultivo in vitro (segundo ensayo).

Clon	Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)													
	0		0,5		1		1,5		2		2,5		3	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
SOM	48	(100) a A	48	(100) a A	48	(100) a A	48	(100) a A	38	(79) a B	21	(44) a C	0	(0)
05	48	(100) a A	48	(100) a A	48	(100) a A	41	(85) a B	32	(66) a B	7	(15) b C	0	(0)
50	48	(100) a A	48	(100) a A	48	(100) a A	46	(90) a B	38	(79) a B	16	(33) a C	0	(0)

Test T-student para diferencias de proporciones. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) en mayúscula para los tratamientos salinos y en minúscula para los clones. Los números entre parentesis indican porcentaje de supervivencia.

En comparación con explantos de otras especies, como la vid (Troncoso et al., 1999a) o el olivo (Troncoso et al., 1999b), el explanto de mandioca es mucho más sensible al estrés salino inducido in vitro, ya que con la adición de niveles de tan sólo 2,5 gl⁻¹ de NaCl al medio de cultivo, se producen pérdidas muy superiores al 50% de plantas. Es decir, que a la citada concentración de 2,5 gl⁻¹, se sobrepasa la dosis letal (DL₅₀) y a la de 3 gl⁻¹ murieron todos los explantos. Probablemente debido a la poca tolerancia a la sal de este material y al salto tan rápido y neto entre tolerancia y no tolerancia, se encontraron pocas diferencias de comportamiento entre los clones considerados, aunque el 05 mostró una ligera mayor sensibilidad a la sal, mientras que SOM-1 pareció ser el más tolerante.

V.3.2. Desarrollo de los explantos supervivientes.

En la tabla 7 se indica el peso fresco del sistema radical, tallo, hojas y del total de la planta, en relación con el nivel de salinidad del medio de cultivo, para cada uno de los clones de mandioca considerados, así como la media de los tres.

Los tres clones experimentaron un aumento significativo ($P<0,05$) del peso fresco de la raíz en el tratamiento de más baja concentración salina (0,5 gl⁻¹), iniciándose después una disminución de la biomasa con el aumento de la sal en el medio, aunque a concentraciones distintas para cada clon. El clon 50 inició un descenso progresivo del peso fresco de la raíz en el tratamiento de 1 gl⁻¹, el clon 05 en 1,5 gl⁻¹ y el clon SOM-1 en el tratamiento de 2 gl⁻¹, lo que pareció indicar un ligero mejor comportamiento del clon SOM-1. En general, el peso fresco de la raíz (media de los tres clones) aumentó significativamente en el tratamiento de 0,5 gl⁻¹ de sal y a partir de ahí

se produjo un descenso paulatino de la biomasa radical con el aumento de la salinidad, aunque sólo la concentración de 2,5 gl^{-1} de NaCl originó un peso fresco de raíz algo inferior al del control. En consecuencia, las concentraciones de NaCl más bajas (0,5 y 1 gl^{-1}) produjeron un efecto beneficioso sobre el desarrollo de la raíz y tan sólo cuando se añadieron 2,5 gl^{-1} de sal se originaron descensos significativos con respecto al control. En cualquier caso, las cantidades de sal comparadas no causaron efectos muy drásticos sobre el sistema radical de las plantas de mandioca.

El comportamiento del tallo ante la salinidad fue parecido al indicado para la raíz, aunque con una mayor sensibilidad, ya que en este caso las pérdidas de biomasa fueron significativamente inferiores al testigo a partir del tratamiento con 1,5 gl^{-1} de NaCl y desde ahí los descensos fueron en aumento.

Tabla 7. Valores medios de biomasa (peso fresco en mg) de raíz, tallo hojas y planta completa en mg, de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50 tras crecer in vitro durante 80 días en medio salinizado con NaCl.

Organo	Clon	Salinidad (gl^{-1} NaCl)					
		0	0,5	1	1,5	2	2,5
Raíz	SOM	175,7 a B	243,3 b A	254,3 a A	222,9 a A	182,3 a B	123,2 a C
	05	184,6 a B	307,5 a A	255,9 a A	156,8 b B	173,2 a B	129,8 a C
	50	121,6 b CD	248,7 b A	198,9 b B	149,3 b C	147,4 a C	95,4 a D
	Media	160,6 C	266,5 A	236,4 B	176,3 C	167,6 C	116,1 D
Tallo	SOM	170,2 b B	188,5 b AB	201,4 b A	201,2 a A	134,5 b C	107,7 a D
	05	248,6 a A	294,9 a A	258,1 a A	188,7 a B	165,1 ab BC	131,0 a C
	50	230,1 a B	285,8 a A	257,2 a AB	189,0 a C	190,3 a C	114,6 a D
	Media	216,3 B	256,4 A	238,9 A	192,9 C	163,3 D	117,8 E
Hojas	SOM	104,3 b C	143,0 b A	118,8 a B	90,7 a C	50,1 a D	27,6 a E
	05	146,4 a A	137,0 b A	135,5 a A	71,0 b B	48,2 a B	18,3 a C
	50	102,4 b C	177,4 a A	129,4 a B	77,7 b D	52,8 a E	25,9 a F
	Media	117,7 B	152,5 A	127,9 B	79,8 C	50,4 D	23,9 E
Planta	SOM	450,1 b B	574,8 b A	574,6 a A	514,8 a A	366,8 a C	258,5 a D
	05	579,5 a B	739,4 a A	649,6 a AB	416,5 b C	386,5 a C	279,1 a D
	50	454,1 b C	711,9 a A	585,5 a B	415,9 b C	390,4 a C	233,2 a D
	Media	494,6 C	675,4 A	603,2 B	449,1 C	381,2 D	256,9 E

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan. Los valores medios se corresponden con el número de individuos que aparecen en la tabla 6.

La sensibilidad de la hoja ante la sal fue todavía mayor que la del tallo. Como en los órganos anteriores, el tratamiento con 0.5 gl^{-1} de NaCl favoreció el desarrollo foliar,

aunque ya la siguiente concentración salina (1 gl^{-1}) originó un peso de hojas similar al del control. A partir de esa solución el efecto de la sal fue muy llamativo, provocando descensos de la masa foliar progresivos muy significativos.

Tabla 8. Valores medios de biomasa (peso seco en mg) de raíz, tallo hojas y planta completa en mg, de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50 tras crecer in vitro durante 80 días en medio salinizado con NaCl.

Organo	Clon	Salinidad (gl^{-1} NaCl)					
		0	0,5	1	1,5	2	2,5
Raíz	SOM	14,8 b B	21,2 a A	21,9 ab A	20,8 a A	17,2 a B	11,0 ab C
	05	17,9 a B	23,6 a A	22,4 a AB	14,3 b C	14,9 ab C	13,5 a C
	50	10,7 c BC	21,0 a A	19,2 b A	13,1 b B	12,3 b B	8,3 b C
	Media	14,5 B	21,9 A	21,2 A	16,1 B	14,8 B	10,9 C
Tallo	SOM	16,5 b B	20,7 b A	20,8 b A	22,7 a A	14,4 a BC	11,8 a C
	05	24,4 a A	27,6 a A	27,5 a A	17,7 b B	15,1 a B	11,2 a C
	50	21,8 a B	28,3 a A	25,7 a A	17,9 b C	17,3 a C	10,8 a D
	Media	20,9 B	25,5 A	24,7 A	19,4 B	15,6 C	11,3 D
Hojas	SOM	19,4 b B	25,6 b A	20,5 b B	19,5 a B	9,7 a C	5,7 a D
	05	29,1 a A	27,0 b A	26,6 a A	12,6 b B	9,1 a B	4,2 a C
	50	22,2 b B	38,9 a A	24,4 a B	13,6 b C	10,9 a C	6,5 a D
	Media	23,6 B	30,5 A	23,8 B	15,2 C	9,9 D	5,5 E
Planta	SOM	50,7 b B	67,5 c A	63,2 b A	63,1 a A	41,4 a C	28,5 a D
	05	71,5 a A	78,2 b A	76,5 a A	44,7 b B	39,0 a BC	28,9 a C
	50	54,7 b C	88,2 a A	69,3 ab B	44,5 b C	40,4 a D	25,6 a E
	Media	58,9 C	78,0 A	69,6 B	50,8 D	40,3 E	27,7 F

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan. Los valores medios se corresponden con el número de individuos que aparecen en la tabla 6.

Como consecuencia de lo indicado para cada uno de los órganos en consideración, la acción de la sal sobre el conjunto de la planta se caracterizó por un aumento de su peso en las concentraciones bajas de NaCl ($0,5$ y 1 gl^{-1}). Es decir, pequeñas cantidades de Na y Cl en el medio de cultivo favorecieron el desarrollo del explanto de mandioca in vitro. Concentraciones salinas superiores disminuyeron de forma proporcional el desarrollo de la planta.

En cuanto a los clones, 05 mostró el peor comportamiento y SOM-1 fue el que resistió mejor la sal, por lo que existieron diferencias suficientes entre ellos para poderlos clasificar por su tolerancia a la sal in vitro.

El peso seco de raíces y de tallo, dentro de su nivel (tabla 8), mostró un comportamiento ante la sal muy parecido al indicado antes para el peso fresco. Por ello, el grado de hidratación de estos tejidos no se vió claramente afectado por la presencia de sal en el medio (tabla 9).

Tabla 9. Efecto de la salinidad en el porcentaje de hidratación de raíz, tallo, hojas, y planta completa de los clones de mandioca SOM-1, 05 y 50, tras crecer in vitro durante 80 días en medio salinizado con NaCl.

<u>Organo</u>	<u>Clon</u>	Salinidad (gl⁻¹ NaCl)					
		0	0,5	1	1,5	2	2,5
Raíz	SOM	91,5 a A	91,2 b A	91,2 a A	90,5 b B	90,5 b B	90,9 a A
	05	89,9 b B	92,0 a A	91,2 a AB	90,9 ab AB	91,3 a AB	89,7 a B
	50	91,3 a A	91,4 ab A	90,3 b A	91,2 a A	91,6 a A	91,0 a A
	Media	90,9 B	91,5 A	90,9 B	90,9 B	91,1 AB	90,6 B
Tallo	SOM	90,3 a A	89,2 b BC	89,7 ab B	88,6 b C	89,2 b BC	89,0 b C
	05	90,1 a AB	90,3 a AB	89,4 b B	90,6 a A	90,6 a A	90,9 a A
	50	90,6 a A	90,1 a B	90,1 a B	90,4 a AB	90,9 a A	90,2 a B
	Media	90,3 A	89,8 BC	89,7 C	89,9 BC	90,3 A	90,1 B
Hojas	SOM	81,2 a A	82,0 a A	82,6 a A	77,6 b B	80,1 a AB	73,8 a C
	05	79,3 b A	80,1 b A	79,5 c A	81,7 a A	80,6 a A	74,1 a B
	50	77,6 c B	77,8 c B	80,9 b A	82,0 a A	78,5 b B	68,9 a C
	Media	79,4 B	80,0 AB	81,0 A	80,4 AB	79,7 B	72,3 C
Planta	SOM	87,6 a A	87,4 a AB	87,8 a A	85,6 b C	86,6 b B	84,6 a D
	05	86,5 b A	87,5 a A	86,7 b A	87,7 a A	87,5 a A	84,9 a B
	50	86,5 b B	86,4 b B	87,1 b AB	87,9 a A	87,0 ab B	83,4 a C
	Media	86,9 A	87,1 A	87,2 A	87,1 A	87,0 A	84,3 B

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan. Los valores medios se corresponden con el número de individuos que aparecen en la tabla 6.

En el caso de la hoja, aunque también se conservaron las tendencias indicadas antes, es decir, incremento del peso en las concentraciones bajas de sal y disminución progresiva al aumentar la cantidad de NaCl, estas pérdidas fueron proporcionalmente inferiores a las del peso fresco en el tratamiento de mayor salinidad. En consecuencia, las hojas sometidas a 2.5 gl⁻¹ de NaCl tuvieron un menor grado de hidratación (tabla 9). Esta deshidratación de la hoja producida por la presencia de sal, coincide con lo indicado por Troncoso et al., (1999a) los cuales, trabajando in vitro con portainjertos de vid, señalaron que la desecación de la planta previa a su muerte comenzó por este órgano.

En consecuencia, la raíz y el tallo mostraron niveles de hidratación parecidos entre sí, aunque ligeramente más altos en el primero. En cualquier caso, lo que es importante destacar es que la salinidad no modificó el grado de hidratación de estos tejidos, por lo que las pérdidas de plantas no pudieron asociarse con desequilibrios hídricos provocados en ellos por cambios en el potencial osmótico de la célula. Por el contrario, concentraciones de $2,5 \text{ g l}^{-1}$ de NaCl afectaron el grado de hidratación de los tejidos foliares in vitro, lo que pudo ser uno de los efectos tóxicos de la salinidad del medio sobre el desarrollo y conservación in vitro de la planta de mandioca.

En la figura 6 se observa el peso fresco y seco relativo al peso de las plantas en el tratamiento control para cada clon y se señala la concentración de sal a partir de la cual los pesos de las plantas toman el mismo valor que el del tratamiento sin NaCl. En los clones 05 y 50 adquieren el peso fresco relativo máximo en el tratamiento de $0,5 \text{ g l}^{-1}$ mientras que en el clon SOM-1 este valor máximo se sitúa entre $0,5$ y 1 g l^{-1} . En el peso seco, los tres clones presentan un valor máximo en el tratamiento de $0,5 \text{ g l}^{-1}$. Las concentraciones de sal a partir de las cuales el peso relativo de las plantas se iguala al del tratamiento control se sitúa en 1.2, 1.4 y 1.7 para los clones 05, 50 y SOM-1 respectivamente tanto para el peso fresco como para el peso seco relativo.

En la figura 7 se observan los ajustes a la función exponencial de Van Genuchten (1983), del peso fresco y seco relativo de las plantas de los clones SOM-1, 05 y 50. En todos los casos, las funciones mostraron un aumento de la biomasa del explanto al aplicar concentraciones bajas (menores de 1 g l^{-1}) de sal.

La concentración umbral del clon 05 se situó en $1,3 \text{ g l}^{-1}$ en el peso fresco mientras que en el peso seco ésta se adelantó a $0,75 \text{ g l}^{-1}$. Los clones SOM-1 y 50 mostraron una concentración umbral en peso fresco de $1,8 \text{ g l}^{-1}$ aproximadamente y de $1,7 \text{ g l}^{-1}$ en peso seco.

La concentración C_{50} en los clones 05 y 50 se situó por debajo de $2,5 \text{ g l}^{-1}$ mientras que en el clon SOM-1 estuvo por encima de esta concentración salina para el peso fresco y seco. En consecuencia y atendiendo a los valores de concentración umbral y la concentración C_{50} para el peso fresco y seco de las plantas de mandioca el clon SOM-1 sería el más tolerante, a continuación el clon 50 y por último el clon 05.

La concentración de sal en el medio, también influyó sobre el desarrollo de la planta expresado como longitud del tallo (fig. 8), número de raíces (fig. 9), número de yemas (fig. 10) y número de hojas (Fig. 11) tras 60 días de cultivo, así como la longitud, número de hojas y superficie foliar al final del ensayo (tabla 10).

fig. 6. Biomasa relativa (% control) en peso fresco y seco de plantas de mandioca tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

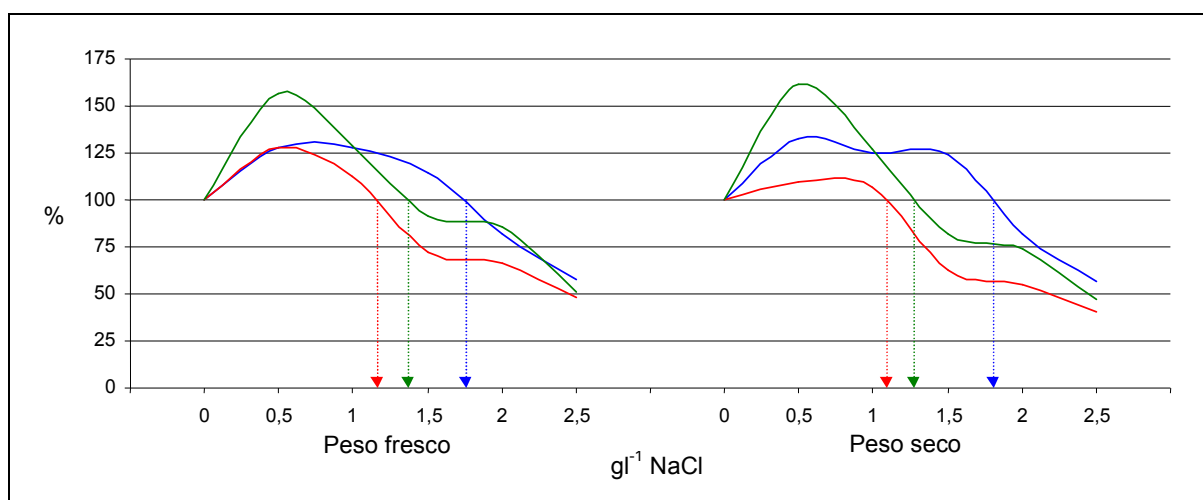
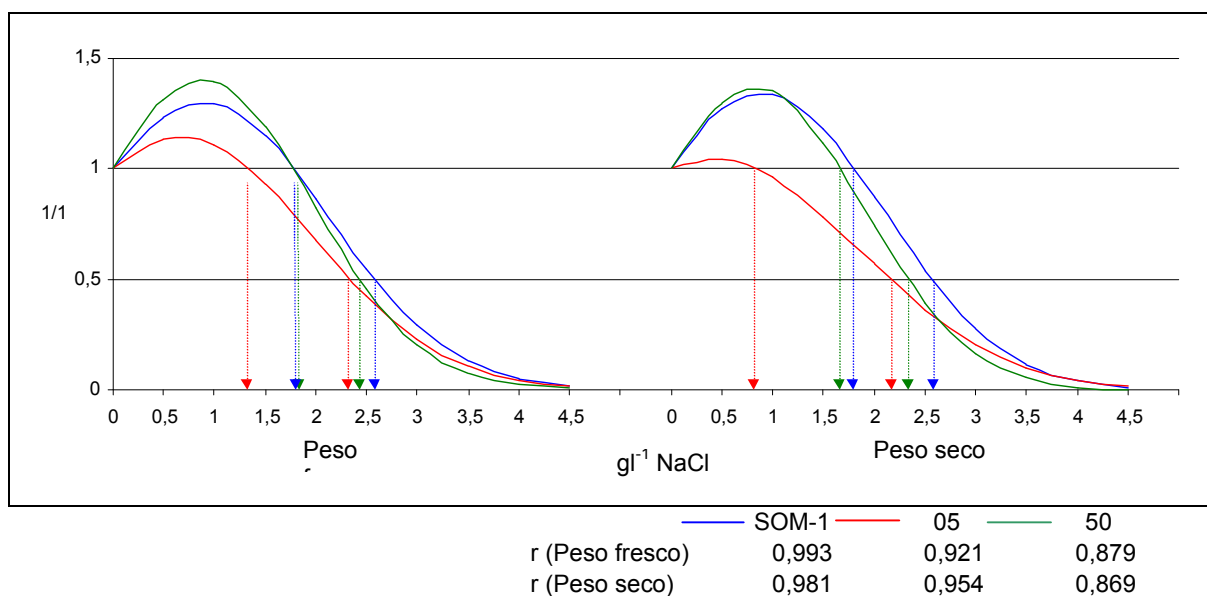


fig 7. Ajuste de la biomasa relativa del peso fresco y seco mediante funciones exponenciales.



En cuanto al crecimiento del tallo de la planta de mandioca, la longitud media del explanto en el momento de la siembra fue de 10 mm. Tras 60 días de cultivo en el medio control sin adición de NaCl, los clones 05 y 50 alcanzaron cerca de 100 mm de altura, mientras que el clon SOM-1 sólo llegó a los 60 mm. Es decir, los clones 05 y 50

fig. 8. Longitud media del tallo tras 60 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

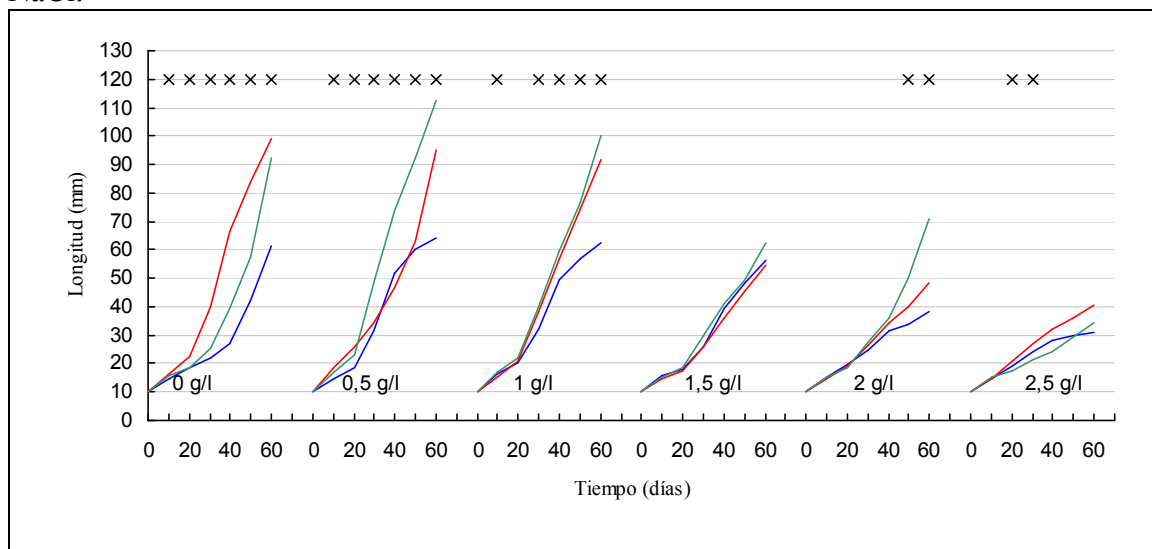


fig. 9. Número de raíces desarrolladas tras 60 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

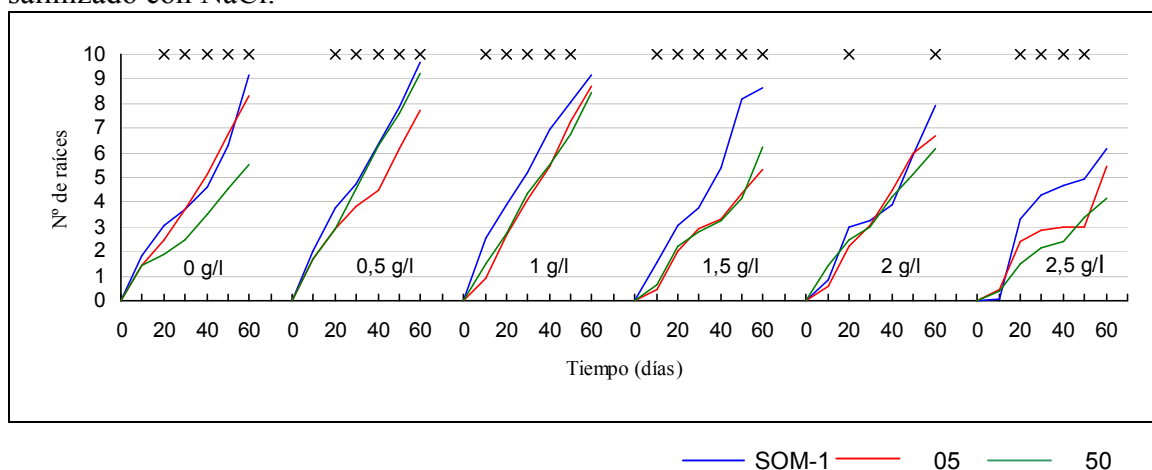


fig. 10. Número de yemas desarrolladas tras 60 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

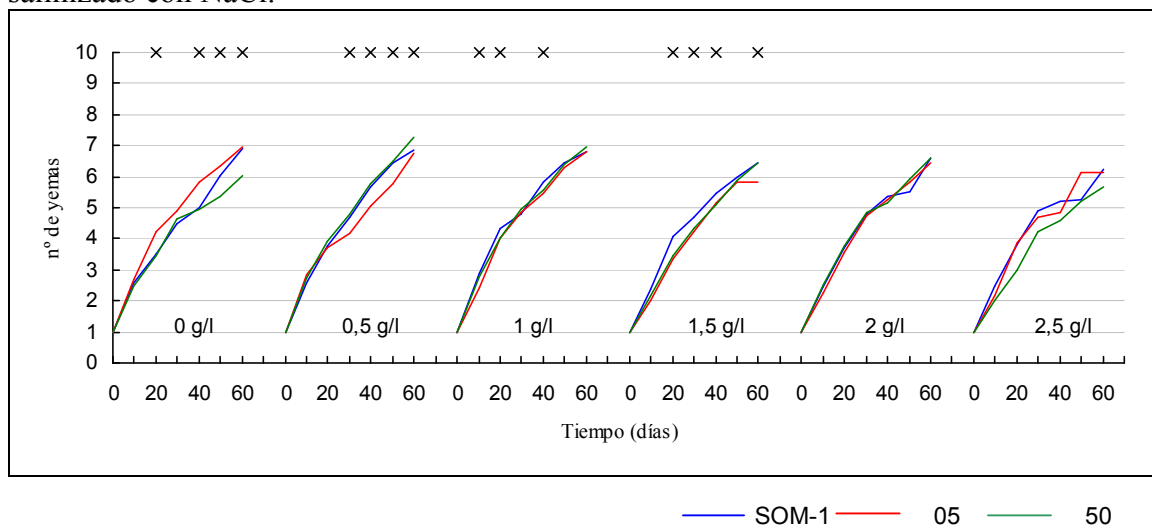


fig. 11. Número de hojas desarrolladas tras 60 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

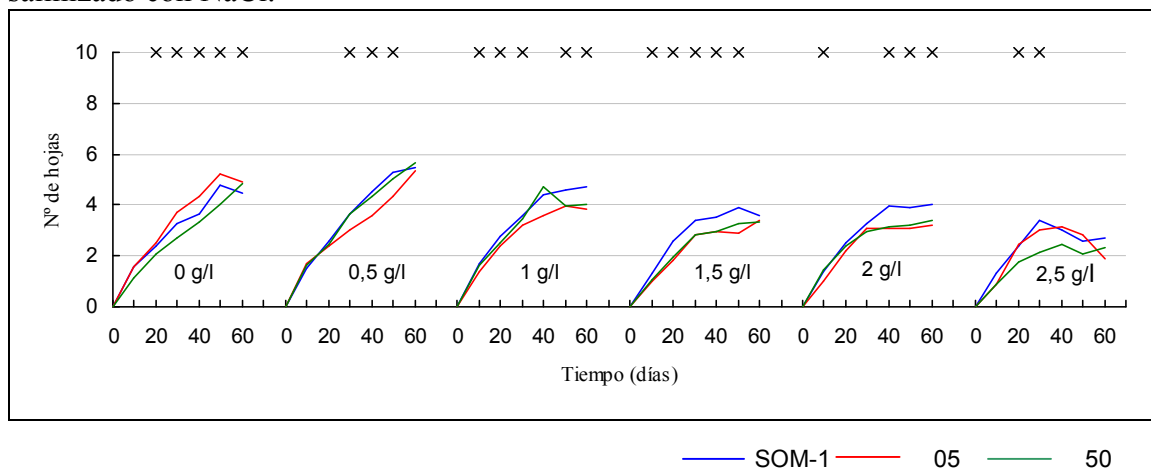


Tabla 10. Longitud, número de hojas y superficie foliar a los 80 días de cultivo in vitro de cada clon, en los diferentes medios salinizados con NaCl.

		Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)																	
Organo	Clon	0		0,5		1		1,5		2		2,5							
Altura																			
(mm)	SOM	113,0	b	A	80,8	c	BC	86,4	b	B	74,3	a	C	49,9	c	D	35,1	a	E
	05	123,3	b	B	193,2	a	A	119,5	a	B	79,1	a	C	67,9	b	C	44,6	a	D
	50	184,9	a	A	138,0	b	BC	128,5	a	B	88,4	a	C	92,8	a	C	43,5	a	D
	Media	141,0		A	134,3		A	112,2		B	80,5		C	70,1		C	39,7		D
Nº hojas																			
	SOM	6,3	a	A	6,3	b	A	4,9	a	B	3,5	a	C	2,1	b	D	1,5	b	E
	05	5,5	b	B	6,8	a	A	4,3	b	C	2,4	b	D	2,4	b	D	1,4	b	E
	50	5,7	b	A	6,1	b	A	4,3	b	B	2,7	b	C	2,9	a	C	2,1	a	D
	Media	5,8		B	6,4		A	4,5		C	2,9		D	2,5		E	1,7		F
Area foliar																			
(mm ²)	SOM	1022	a	AB	1042	b	A	895	b	B	627	a	C	262	b	D	148	ab	D
	05	1154	a	AB	1088	b	A	1147	a	A	372	b	B	353	b	B	57	b	C
	50	1001	a	B	1260	a	A	1001	ab	B	574	a	C	468	a	C	207	a	D
	Media	1058		AB	1125		A	1014		B	526		C	361		D	155		E

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan. Los valores medios se corresponden con el número de individuos que aparecen en la tabla 6.

crecieron más que el clon SOM-1, lo que se debe tener en cuenta a la hora de considerar la acción de la sal. Como en los casos anteriores, los tratamientos con bajas concentraciones de NaCl en el medio de cultivo ($0,5$ y 1 gl^{-1}) mantuvieron o incluso mejoraron los crecimientos indicados para el medio control. Los aumentos en el grado

de salinidad del medio provocaron descensos en el crecimiento del tallo de los tres clones siendo estos descensos relativamente menores en el clon SOM-1.

Del mismo modo las concentraciones bajas de NaCl (0.5 y 1 g l^{-1}) no perjudicaron e incluso favorecieron el desarrollo de raíces, yemas y hojas, pero concentraciones mayores de sal actuaron negativamente. Aunque no existieron grandes diferencias en el comportamiento de los tres clones en consideración, el clon SOM-1 tuvo una ligera mayor tolerancia.

V.3.3. Influencia de la concentración de NaCl sobre el contenido de nutrientes en plantas de mandioca cultivadas in vitro.

En las tablas 11, 12, 13, 14, 15 y 16 se indican los contenidos de nutrientes, respectivamente de las raíces, tallos, hojas y planta completa en cada clon y la media de los tres clones para cada tratamiento salino hasta 2 g l^{-1} de NaCl. Las plantas tratadas con más cantidad de sal no pudieron ser analizadas ya que la elevada mortandad y el bajo desarrollo no permitió disponer de material suficiente.

V.3.3.1. Nitrógeno.

Los tratamientos salinos no parecieron influir sobre los contenidos de nitrógeno de los tres órganos en consideración y en consecuencia de la planta completa (tabla 11). No obstante, se observaron variaciones puntuales entre los clones y tratamientos salinos que no pudieron relacionarse con la presencia de sal en el medio al no existir una relación clara entre las variaciones de la concentración de nitrógeno en los órganos de la planta y los incrementos de salinidad del medio. Tallos y hojas mostraron niveles algo superiores a los de la raíz lo que puede relacionarse con la elevada movilidad de este elemento en la planta (Street y Öpik, 1984).

Estos contenidos de nitrógeno, fueron superiores a los determinados por Troncoso et al., (1999a) para plantas de vid in vitro. En este trabajo también se indicó que la presencia de la sal (NaCl) en el medio de cultivo no alteró los contenidos de nitrógeno. Por el contrario, en trabajos realizados en otras especies vegetales en condiciones de invernadero (Cram, 1973; Deane-Drummond y Glass, 1982) se observó que la salinización reducía el contenido de nitrógeno de los tejidos de la planta.

Tabla 11. Concentración de nitrógeno y fósforo (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

Nitrógeno		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	4,82 a AB	5,25 a A	4,47 a BC	4,03 b C	5,28 a A
	05	4,62 a AB	4,74 a AB	4,02 a B	4,57 ab AB	5,00 a A
	50	4,94 a A	4,55 a A	4,06 a A	4,88 a A	4,90 a A
	Media	4,79 AB	4,85 AB	4,18 C	4,49 BC	5,06 A
Tallo	SOM	5,81 b A	4,70 b B	4,52 b B	4,66 b B	5,93 b A
	05	6,51 ab A	6,37 a A	5,08 ab B	6,88 a A	6,98 a A
	50	7,33 a A	5,59 ab B	5,62 a B	7,04 a A	7,15 a A
	Media	6,55 A	5,55 BC	5,07 C	6,19 AB	6,68 A
Hojas	SOM	6,31 a A	5,59 a A	5,89 a A	6,04 ab A	5,60 a A
	05	6,01 a A	6,35 a A	5,54 a B	6,34 a A	4,98 a C
	50	6,56 a A	5,98 a A	6,40 a A	5,83 b A	5,66 a A
	Media	6,29 A	5,97 A	5,94 A	6,07 A	5,41 B
Planta	SOM	5,64 a A	5,18 a AB	4,96 a AB	4,91 b B	5,60 a AB
	05	5,71 a AB	5,82 a A	4,88 a B	5,93 a A	5,65 a AB
	50	6,28 a A	5,37 a A	5,36 a A	5,92 a A	5,90 a A
	Media	5,88 A	5,46 AB	5,07 B	5,58 A	5,72 A
Fósforo		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	0,493 b AB	0,372 b B	0,412 b AB	0,427 b AB	0,567 b A
	05	0,489 b B	0,667 a AB	0,555 ab B	0,834 a A	1,096 a A
	50	0,780 a AB	0,535 a B	0,643 a B	0,902 a AB	1,097 a A
	Media	0,587 B	0,525 B	0,537 B	0,721 AB	0,920 A
Tallo	SOM	0,793 a A	0,638 a AB	0,672 a AB	0,532 a B	0,832 a A
	05	0,265 c C	0,421 b B	0,290 b C	0,505 a AB	0,621 b A
	50	0,502 b A	0,364 b B	0,374 b B	0,546 a A	0,549 b A
	Media	0,520 AB	0,474 B	0,445 B	0,528 AB	0,667 A
Hojas	SOM	0,498 a B	0,659 a AB	0,467 a B	0,448 a B	0,469 a B
	05	0,349 b AB	0,525 b AB	0,320 c C	0,389 b B	0,391 a B
	50	0,459 a AB	0,483 b A	0,405 b B	0,436 a AB	0,413 a A
	Media	0,435 B	0,556 A	0,397 B	0,425 B	0,424 B
Planta	SOM	0,594 a AB	0,556 a AB	0,517 a AB	0,469 a B	0,623 a A
	05	0,368 b C	0,538 a AB	0,388 a BC	0,576 a AB	0,702 a A
	50	0,580 a AB	0,461 a A	0,474 a AB	0,628 a AB	0,686 a B
	Media	0,514 B	0,518 B	0,460 BC	0,558 B	0,670 A

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan. (n=6).

Este comportamiento diferente pudo estar relacionado con que en el medio de cultivo de condiciones in vitro existió bastante nitrógeno en forma amoniacal, mientras que en el otro, usaron N-nítrico y la disminución de nitrógeno en plantas se considera principalmente debida a que la presencia de Cl^- en el medio inhibe la adsorción de NO_3^- (Aslam et al. 1984; Gorham et al 1986).

V.3.3.2. Fósforo.

En los tres órganos se observaron contenidos de fósforo más elevados que los normalmente obtenidos en plantas in vitro de otras especies (tabla 11). Así Troncoso et al (1999a) determinaron niveles de P próximos al 0,4% para distintos portainjertos de vid in vitro y Troncoso et al (1999b) niveles de 0,1% en plantulas de olivo. Se observó también que los contenidos de P en raíz y en tallo fueron más elevados que los de hojas lo que pudo estar relacionado con la baja movilidad de este nutriente en la planta. En los dos primeros órganos existió una cierta acumulación de P en los tratamientos con mayor concentración salina, lo que concuerda con las indicaciones de Grattan y Grieve (1992) para plántulas cultivadas en condiciones externas. También este hecho pudo estar relacionado con la baja movilidad del nutriente indicada antes y con el menor ritmo de crecimiento de las plantas sometidas a salinidad.

En plantas completas, el fósforo aumentó significativamente en el tratamiento de 2 gl^{-1} observándose diferencias entre clones sólo en el tratamiento control.

V.3.3.3. Potasio.

Como en el caso del fósforo, también los contenidos mayores de potasio se encontraron en la raíz, seguidos de los del tallo y siendo la hoja el órgano con menor nivel (tabla 12).

Como se observa en dicha tabla, no hubo una relación clara entre el contenido de potasio en los tejidos de la planta y la salinidad del medio. Sólo en el caso del tallo se encontró una relación inversa entre estos parámetros.

Esta falta de correlación a nivel general no coincide con lo indicado por Troncoso et al., (1999) para material de vid in vitro así como por otros autores (Li et al., 1989; Khan et al., 1999; Pardossi et al., 1999; Short y Colmer, 1999) para plantas en condiciones externas, quienes encuentran disminuciones de potasio muy claras al

Tabla 12. Concentración de potasio y calcio (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

Potasio		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	4,98 a A	4,31 b B	4,71 a AB	4,50 a AB	4,50 a AB
	05	4,74 ab A	4,86 a A	4,58 ab AB	4,57 a AB	4,41 a AB
	50	4,43 b AB	4,91 a A	4,23 b B	4,30 a B	4,30 a B
	Media	4,72 A	4,69 A	4,50 A	4,46 A	4,40 A
Tallo	SOM	3,85 a A	2,69 b B	2,56 a B	2,50 a B	2,75 a B
	05	2,79 b B	3,42 a A	2,22 b BC	2,47 a BC	2,06 b C
	50	3,47 a A	3,72 a A	2,78 a B	2,52 a B	2,32 b B
	Media	3,37 A	3,28 A	2,52 B	2,50 B	2,38 B
Hojas	SOM	1,98 a C	2,88 ab A	2,22 b BC	2,25 ab B	1,97 a C
	05	1,76 b C	2,75 b A	1,93 c BC	2,10 b B	1,77 b C
	50	1,86 ab C	2,96 a A	2,41 a B	2,35 a B	1,90 ab C
	Media	1,87 C	2,87 A	2,19 B	2,23 B	1,88 C
Planta	SOM	3,60 a A	3,29 a A	3,16 a A	3,08 a A	3,07 a A
	05	3,09 a A	3,68 a A	2,91 a A	3,05 a A	2,75 a A
	50	3,26 a AB	3,86 a A	3,14 a AB	3,06 a AB	2,84 a B
	Media	3,32 AB	3,61 A	3,07 AB	3,06 AB	2,89 B
Calcio		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	0,415 a A	0,267 b C	0,338 a B	0,397 a AB	0,356 a AB
	05	0,317 b A	0,303 b A	0,311 a A	0,296 b A	0,257 b A
	50	0,290 b AB	0,341 a A	0,261 b B	0,272 b AB	0,302 b AB
	Media	0,341 A	0,304 A	0,303 A	0,322 A	0,305 A
Tallo	SOM	0,943 a A	0,559 b C	0,678 a BC	0,631 a BC	0,761 a B
	05	0,639 b A	0,605 ab A	0,393 b B	0,431 b B	0,441 b B
	50	0,537 c B	0,650 a A	0,428 b C	0,399 b C	0,361 b C
	Media	0,706 A	0,605 AB	0,500 B	0,487 B	0,521 B
Hojas	SOM	0,589 a A	0,653 a A	0,484 a B	0,447 a B	0,292 b C
	05	0,629 a A	0,582 b A	0,376 b B	0,389 a B	0,333 ab B
	50	0,500 b A	0,553 b A	0,410 b B	0,390 a B	0,378 a B
	Media	0,573 A	0,596 A	0,423 B	0,409 B	0,335 C
Planta	SOM	0,649 a A	0,493 a A	0,500 a A	0,492 a A	0,470 a A
	05	0,528 ab A	0,497 a A	0,360 b B	0,372 b B	0,344 a B
	50	0,442 b AB	0,515 a A	0,366 b BC	0,354 b BC	0,347 a C
	Media	0,540 A	0,501 A	0,409 B	0,406 B	0,387 B

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan. (n=6)

Tabla 13. Concentración de magnesio y sodio (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

Magnesio		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	0,168 b AB	0,155 b BC	0,137 b C	0,168 b AB	0,182 c A
	05	0,200 ab A	0,238 a A	0,236 a A	0,251 a A	0,231 b A
	50	0,233 a A	0,228 a A	0,217 a A	0,244 a A	0,288 a A
	Media	0,200 A	0,207 A	0,197 A	0,221 A	0,234 A
Tallo	SOM	0,113 b A	0,082 b B	0,093 ab B	0,091 b B	0,115 a A
	05	0,132 a A	0,131 a A	0,088 b B	0,146 a A	0,132 a A
	50	0,144 a A	0,122 a AB	0,112 a B	0,144 a A	0,133 a AB
	Media	0,130 A	0,112 AB	0,098 B	0,127 A	0,126 A
Hojas	SOM	0,223 a A	0,214 a A	0,174 a B	0,171 a B	0,135 b C
	05	0,195 b A	0,185 b A	0,132 c B	0,127 c B	0,120 c B
	50	0,202 b A	0,192 b A	0,164 b B	0,159 b BC	0,148 a C
	Media	0,207 A	0,197 A	0,157 B	0,152 B	0,134 C
Planta	SOM	0,168 a A	0,150 a A	0,135 a A	0,143 a A	0,144 a A
	05	0,176 a A	0,185 a A	0,152 a A	0,174 a A	0,161 a A
	50	0,193 a A	0,181 a A	0,164 a A	0,182 a A	0,190 a A
	Media	0,179 A	0,172 A	0,150 A	0,167 A	0,165 A
Sodio		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	0,202 a C	0,331 a B	0,387 a B	0,563 a A	0,629 a A
	05	0,087 b D	0,198 b C	0,242 b C	0,303 b B	0,507 b A
	50	0,179 a C	0,205 b C	0,262 b BC	0,324 b B	0,476 b A
	Media	0,156 D	0,245 C	0,297 C	0,396 B	0,537 A
Tallo	SOM	0,570 a C	1,827 b B	2,512 a A	2,582 a A	2,790 a A
	05	0,470 b C	1,823 b B	2,098 b B	2,603 a A	2,837 a A
	50	0,412 b C	2,257 a B	2,465 a AB	2,755 a A	2,707 a A
	Media	0,484 D	1,969 C	2,358 B	2,647 A	2,778 A
Hojas	SOM	0,025 b E	0,289 b D	0,358 a C	0,712 a B	0,946 a A
	05	0,086 a C	0,475 a B	0,443 a B	0,827 a A	0,729 a A
	50	0,079 a C	0,291 b B	0,450 a B	0,728 a A	0,836 a A
	Media	0,063 C	0,352 B	0,417 B	0,756 A	0,837 A
Planta	SOM	0,266 a B	0,816 a AB	1,086 a A	1,285 a A	1,455 a A
	05	0,214 a B	0,832 a AB	0,928 a AB	1,245 a A	1,358 a A
	50	0,223 a B	0,917 a AB	1,059 a AB	1,269 a A	1,339 a A
	Media	0,234 C	0,855 B	1,024 AB	1,266 AB	1,384 A

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan. (n=6).

aumentar la salinidad.

Probablemente, el comportamiento tan especial del material de mandioca in vitro que soporta relativamente bien concentraciones de hasta 2 g l^{-1} de NaCl en el medio pero que cae rápidamente a niveles más altos de sal, pueda ser una explicación a la falta de correlación negativa K-Na en algunos órganos.

V.3.3.4. Calcio.

En cuanto al calcio (tabla 12), al contrario de lo indicado para el potasio, los niveles del tallo y de la hoja fueron superiores a los de la raíz.

Los contenidos de calcio en la raíz no fueron alterados por la presencia de sal en el medio, mientras que los de tallo y hojas mostraron un ligero descenso al aumentar la salinidad del medio. Descensos similares de calcio con la sal fueron indicados por Troncoso et al (1999) para plantas de vid in vitro.

Así mismo, Somal y Yapa (1998), Esechie y Rodríguez (1998) y Yahya, (1998), encontraron un cierto antagonismo entre calcio y NaCl en plantas cultivadas en condiciones externas.

V.3.3.5. Magnesio.

Los niveles medios más altos de magnesio (tabla 13) se encontraron en las raíces donde no fueron alterados por la presencia de NaCl en el medio.

El tallo mostró contenidos más bajos sin que tampoco la sal los modificara. Por el contrario, la hoja presentó cantidades de magnesio similares a los de la raíz en plantas control (0 g l^{-1}) y tratadas con $0,5 \text{ g l}^{-1}$ de sal, y más bajas (parecidas a las del tallo) en las sometidas a concentraciones salinas superiores.

V.3.3.6. Sodio.

Los contenidos de sodio (tabla 13) de todos los órganos y en consecuencia de la planta completa aumentaron al crecer la concentración de sal en el medio. No obstante, dicho aumento fue más significativo al pasar desde el tratamiento control, sin sal, a las primeras aplicaciones de NaCl. Después, los incrementos de Na^+ en los tejidos fueron

Tabla 14. Concentración de cloro (%) y cobre (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

Cloro		Salinidad (g l^{-1} NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	1,172 a D	1,672 a C	2,123 b B	2,885 a A	2,950 a A
	05	1,403 a C	1,848 a C	2,470 a B	3,068 a A	3,065 a A
	50	1,352 a B	1,775 a B	2,300 ab A	2,497 b A	2,373 b A
	Media	1,309 D	1,765 C	2,298 B	2,817 A	2,796 A
Tallo	SOM	0,775 a C	1,920 a B	2,852 a A	2,957 b A	2,923 b A
	05	0,658 a D	1,502 b C	2,738 a B	3,650 a A	3,302 ab A
	50	0,700 a D	1,713 ab C	2,915 a B	3,638 a A	3,687 a A
	Media	0,711 D	1,712 C	2,835 B	3,415 A	3,304 A
Hojas	SOM	0,301 a CD	0,083 b D	0,446 a BC	0,805 a A	0,682 a AB
	05	0,319 a CD	0,145 a D	0,509 a BC	0,967 a A	0,715 a B
	50	0,139 b C	0,193 a C	0,568 a B	0,757 a B	1,265 a A
	Media	0,253 C	0,141 C	0,508 B	0,843 A	0,887 A
Planta	SOM	0,749 a B	1,225 a AB	1,807 a A	2,216 a A	2,185 a A
	05	0,793 a B	1,165 a AB	1,906 a AB	2,562 a A	2,360 a A
	50	0,730 a B	1,227 a AB	1,928 a AB	2,297 a A	2,442 a A
	Media	0,758 B	1,206 B	1,880 AB	2,358 A	2,329 A
Cobre		Salinidad (g l^{-1} NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	23 a A	14 a B	16 a B	17 a B	24 b A
	05	21 a B	14 a B	17 a B	18 a B	31 a A
	50	17 a A	15 a A	8 b B	12 a AB	13 c AB
	Media	20 A	14 B	14 B	15 B	23 A
Tallo	SOM	23 a A	8 b B	22 a A	12 a A	15 a A
	05	10 b A	10 b A	11 b A	10 a A	16 a A
	50	11 b B	14 a AB	8 b B	19 a A	19 a A
	Media	15 A	10 A	14 A	14 A	17 A
Hojas	SOM	16 b A	12 a A	11 b A	13 a A	15 a A
	05	5 c B	12 a AB	6 c B	17 a A	19 a A
	50	24 a A	8 a C	18 a AB	14 a BC	21 a AB
	Media	15 AB	11 B	11 B	15 AB	19 A
Planta	SOM	36 a A	11 a B	29 a A	24 a AB	31 a A
	05	12 b B	12 a B	11 b B	15 b B	22 ab A
	50	17 b AB	12 a BC	11 b C	15 b AB	18 b A
	Media	22 AB	12 C	17 BC	18 BC	24 A

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. Test de rango múltiple de Duncan. ($n=6$).

mayores, al pasar de una concentración de sal ($1,5 \text{ g l}^{-1}$ de NaCl) a otra superior (2 g l^{-1} de NaCl)

V.3.3.7. Cloro.

Los contenidos de cloro (tabla 14) en los tejidos de los distintos órganos mostraron una evolución ante la concentración de sal en el medio similar a la indicada para el Na^+ . Es decir, fuerte aumento inicial incluso con pequeñas cantidades de sal y posterior ralentización de los incrementos en las concentraciones más altas. En consecuencia, en ambos casos la disponibilidad de los iones Na^+ o Cl^- en la solución del nutritiva determinó una absorción y transporte rápidos de esos iones en los tejidos de la planta. Estas acumulaciones de iones tóxicos junto con un menor grado de hidratación foliar indicado antes pudieron ser responsables del comportamiento negativo de la sal, en coincidencia con lo indicado por Adams et al., (1992).

V.3.3.8. Cobre.

La concentración de cobre (tabla 14) en los tres órganos fue similar no viéndose afectada por el aumento de la salinidad en el medio de cultivo.

V.3.3.9. Hierro.

La concentración de hierro (tabla 15) en la raíz fue muy superior a la observada en el tallo y hojas siendo muy similares entre clones. La salinidad del medio no afectó a la concentración de hierro en ninguno de los órganos.

En general las plantas de los tres clones presentaron concentraciones similares y no se vieron afectadas por la salinidad.

V.3.3.10. Manganeso.

La concentración de manganeso (tabla 15) de los tres órganos disminuyó con el aumento de la salinidad del medio. La hoja tuvo un mayor contenido de manganeso que la raíz y ésta a su vez fue mayor que la observada en el tallo.

Tabla 15. Concentración de hierro y manganeso (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

Hierro		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	689 a A	553 a A	590 a A	660 b A	688 b A
	05	489 b B	673 a AB	534 a B	777 ab A	755 ab A
	50	740 a AB	675 a AB	581 a B	912 a A	928 a A
	Media	639 B	634 B	568 B	783 A	790 A
Tallo	SOM	177 a A	95 a B	155 a AB	126 a AB	170 a AB
	05	100 b B	79 ab BC	64 b C	70 b BC	143 a A
	50	100 b A	70 b B	63 b B	84 b AB	84 b AB
	Media	126 A	81 B	94 AB	93 AB	132 A
Hojas	SOM	227 a A	189 a A	222 a A	226 a A	190 a A
	05	198 b A	154 b BC	145 b C	187 b AB	206 a A
	50	214 ab A	191 a AB	196 a A	163 b BC	153 b C
	Media	213 A	178 B	188 AB	192 AB	183 AB
Planta	SOM	364 a A	279 a A	322 a A	337 a A	349 a A
	05	262 a A	302 a A	248 a A	344 a A	368 a A
	50	352 a A	312 a A	280 a A	386 a A	388 a A
	Media	326 A	298 A	283 A	356 A	368 A
Manganeso		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	244 a A	196 a B	167 b B	178 a B	193 a B
	05	200 b A	215 a A	219 a A	156 a B	141 b B
	50	206 b A	215 a A	174 b A	132 b B	132 b B
	Media	217 A	209 AB	187 B	155 C	156 C
Tallo	SOM	203 a A	123 b BC	147 a B	101 a C	113 a C
	05	223 a A	141 a B	108 b C	95 a C	100 b C
	50	157 b A	153 a A	100 b B	94 a B	95 b B
	Media	194 A	139 B	118 C	97 D	103 CD
Hojas	SOM	273 a A	202 b B	213 b B	210 a B	183 a C
	05	226 b B	229 a A	189 c C	197 ab BC	159 b D
	50	242 ab A	227 a A	231 a A	184 b B	173 ab B
	Media	247 A	219 B	211 BC	197 C	172 D
Planta	SOM	240 a A	174 a B	176 a B	163 a B	163 a B
	05	216 ab A	195 a AB	172 a BC	150 a D	133 a D
	50	202 b A	198 a A	169 a AB	137 a B	133 a B
	Media	219 A	189 B	172 B	150 C	143 C

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. Test de rango múltiple de Duncan. ($n=6$).

V.3.3.11. Cinc.

La concentración de cinc tampoco se vió afectada por la salinidad del medio en ninguno de los tres órganos siendo mayor el contenido observado en la raíz.

Tampoco se observaron diferencias importantes entre clones para cada tratamiento salino.

Tabla 16. Concentración de cinc (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los clones SOM-1, 05 y 50 tras 80 días de cultivo in vitro en medio salinizado con NaCl.

Cinc		Salinidad (gl^{-1} NaCl)				
Organo	Clon	0	0,5	1	1,5	2
Raíz	SOM	122 b B	206 a A	124 c B	110 b B	128 a B
	05	108 b D	202 a A	141 b BC	163 a B	118 a CD
	50	192 a A	194 a A	155 a A	158 a A	135 a A
	Media	140 B	200 A	140 B	143 B	127 B
Tallo	SOM	141 a A	77 b C	111 a BC	88 b BC	121 a AB
	05	79 b BC	100 a B	63 b C	92 b B	132 a A
	50	96 b BC	102 a BC	83 b C	152 a A	128 a AB
	Media	105 AB	93 B	86 B	111 AB	127 A
Hojas	SOM	130 a A	131 a A	107 a B	94 a B	124 a A
	05	123 a A	112 b A	75 b B	110 a A	121 a A
	50	100 b A	101 b A	101 a A	112 a A	110 a A
	Media	118 A	115 A	95 B	105 AB	118 A
Planta	SOM	111 a AB	156 a A	94 a B	79 b B	125 a AB
	05	103 a B	138 a A	93 a B	121 a AB	124 a AB
	50	129 a A	132 a A	113 a A	141 a A	124 a A
	Media	114 B	142 A	100 B	114 B	124 AB

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. Test de rango múltiple de Duncan. ($n=6$).

V. 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran una cierta semejanza en el comportamiento ante la sal in vitro de los tres clones de mandioca considerados, aunque con mayor tolerancia del clon SOM-1 y peor del clon 05.

La supervivencia de los tres clones es del 100% en los tratamientos control, 0,5 y 1 gl^{-1} de NaCl, lo que indica una buena predisposición de la mandioca a ser cultivada in vitro y una total tolerancia a bajas concentraciones de sal. En efecto, la tolerancia se

pone más de manifiesto al considerar la influencia positiva de estos niveles de NaCl en el medio, sobre el peso y desarrollo de la planta. Acciones beneficiosas del ión Na^+ sobre el desarrollo de las plantas C_4 han sido descritas por Johnston et al., (1984). En las plantas glicofitas (Brownell, 1965) y C_4 (Brownell, 1979) el ión Na^+ tienen carácter de micronutriente. Angelov et al., (1993) clasifican a la mandioca intermedia entre las plantas C_3 y C_4 .

Marschner (1971) y Marschner et al., (1981) también encontraron efectos positivos de la presencia en el medio de pequeñas cantidades de Na^+ en el desarrollo de las plantas de remolacha.

Según Marschner y Possingham (1975) el aumento de crecimiento atribuido al ión Na^+ es debido principalmente a su efecto sobre la expansión celular y el balance hídrico de las plantas. Milford et al., (1977) describen un mayor área foliar, grosor y succulencia cuando parte del K^+ era sustituido por Na^+ en el sustrato.

En el extremo opuesto, la aplicación a la solución nutritiva de 3 gl^{-1} de NaCl originó la muerte de todas las plantas de cada clon. Es decir, sólo quedaron los tratamientos de 1.5, 2.0 y 2.5 gl^{-1} de NaCl para poder establecer diferencias de comportamiento entre clones. El hecho de que existan variaciones relativamente pequeñas de niveles salinos entre estos tratamientos podía dificultar, en principio, el logro del objetivo. No obstante, se establecieron diferencias de comportamiento entre ellos. El clon SOM-1 es el que mejor comportamiento muestra tanto en supervivencia como en el peso (biomasa) y en el desarrollo-crecimiento. En el lado opuesto el clon 05 tiene una mayor sensibilidad a la sal. Este mejor comportamiento ante el NaCl puede estar relacionado con su procedencia del desierto de Somalia, área salina de gran aridez.

La presencia de la sal en el medio, en especial en la concentración de 2.5 gl^{-1} de NaCl, la más elevada que permitió plantas vivas, influyó sobre el nivel hídrico de la hoja, posiblemente el principio de una ulterior desecación total y el aumento de los contenidos de Na^+ y Cl^- en los tejidos de la planta. Es decir, se produjeron los dos fenómenos, modificación del potencial osmótico y desequilibrio o toxicidad nutritiva, que en la bibliografía se considera como responsables del efecto perjudicial de la sal.

VI. TOLERANCIA A LA SALINIDAD EN CONDICIONES DE INVERNADERO

VI.1. INTRODUCCIÓN.

Los estudios sobre aspectos fisiológicos de la respuesta de las plantas a la salinidad, tienen como punto de encuentro el hecho de que las plantas con mayor resistencia a este estrés son capaces de mantener mayores tasas de crecimiento que las menos resistentes en niveles de salinidad equivalentes (Neumann 1997). Sin embargo, la introducción de cultivos más resistentes es un proceso relativamente lento ya que los rasgos que son heredables y pueden contribuir a esta resistencia no están aún bien identificados.

Es generalmente aceptado, que la respuesta de crecimiento de la planta a la salinidad es multigénica y que es necesario un conocimiento más profundo de los procesos fisiológicos para poder entender la diferencia de resistencia a la salinidad que se observan entre diferentes plantas y entre plantas de la misma variedad.

La respuesta de crecimiento de una planta puede variar:

- Con el grado de estrés en el que se encuentra (bajo, moderado o severo).
- Con el órgano, variedad o especie con la que se trabaje.
- Con el estado de desarrollo de la planta y duración del estrés.

Munns (1993), planteó la hipótesis de la doble fase para explicar la inhibición del crecimiento en plantas sometidas a estrés salino. Así, el crecimiento de la planta es inhibido en una primera fase por una respuesta celular al efecto osmótico de la solución externa, es decir, es una respuesta al descenso de la disponibilidad de agua en el suelo, y a continuación, fase 2, el crecimiento comienza a ser inhibido por el efecto tóxico de la acumulación excesiva de sal dentro de la planta. Según Neumann (1997), la diferencia de crecimiento entre variedades, como respuesta al estrés salino sólo sería de esperar después de una prolongada exposición de éstas a la sal, esto es, al comienzo de la fase 2, después de semanas o meses. De esta manera, tasas elevadas de acumulación de sal en hojas maduras de las variedades más sensibles, agudizarían el efecto tóxico acelerando la senescencia y/o necrosis foliar. La aceleración en la pérdida de superficie foliar como resultado de la senescencia, reduciría la fotosíntesis y los niveles de hormonas esenciales, mermando la capacidad de generar nuevo tejido y por tanto inhibiendo el futuro crecimiento de la planta. Esta hipótesis de las dos fases, sugiere que una parte de

la diversidad varietal en el crecimiento aparecería lentamente y podría ser causada por diferencias genotípicas en la velocidad de acumulación de sal.

El efecto tóxico de la acumulación de sal, a largo plazo, es indudablemente el más importante tanto para el desarrollo vegetativo como reproductor (Khatum y Flowers, 1995).

En esta hipótesis de las dos fases, se presta especial atención a la velocidad de senescencia de las hojas, como rasgo en la planta que es fácil de medir y que puede actuar como un marcador de la diversidad varietal en la acumulación de sal. Sin embargo, esta hipótesis también afirma que la reducción del crecimiento por la sal, sería similar en variedades sensibles y tolerantes cuando solamente la fase osmótica de la inhibición del crecimiento fuese operativa. De esta manera, He y Cramer (1993) observan diferencias en el comportamiento de dos variedades del género *Brasica* 3 días después de someterlas a estrés salino, sin que se observen diferencias en sus respectivas concentraciones foliares de Na^+ y de Cl^- . Por tanto, la selección y cruzamiento para aumentar la resistencia no debería basarse casi exclusivamente en la velocidad de acumulación de sal dentro de las hojas.

Cramer et al., (1994), encuentran diferencias en la velocidad de elongación de hojas de 2 variedades de maíz entre las 5 horas y 9 días de salinización, donde la variedad sensible presentó mayor concentración de Na^+ . Estos autores señalan diferencias de crecimiento entre variedades, que no se corresponden con una acumulación de sal sino como respuesta a la reducción en la disponibilidad de agua debida al efecto osmótico.

El nivel de tolerancia señalado, se basa en el rendimiento relativo de un cultivo que crece en un suelo salinizado, con respecto al mismo cultivo que crece en suelo no salinizado bajo condiciones similares. En casi todos los casos, los datos están basados en una técnica según la cual los cultivos se hacen crecer en suelos cuyos niveles salinos se han ajustado artificialmente después del establecimiento de las plántulas. Al usarse este método, los rendimientos del cultivo se pueden relacionar con los valores comparables de la CE de suelos salinos y no salinos.

En el laboratorio, se ha podido estudiar la tolerancia a la salinidad de un gran número de especies vegetales. Las pruebas de laboratorio y los experimentos en invernadero son menos costosos, menos laboriosos y menos lentos que las pruebas de campo y casi siempre dan valiosas guías sobre el comportamiento del suelo en el campo. Las pruebas de invernadero son útiles cuando se desea determinar la respuesta

de las plantas de acuerdo con su crecimiento y pueden usarse también para determinar si un suelo contiene suficientes sales solubles o sodio intercambiable, que afecte el desarrollo vegetal en forma adversa. (Royo y Aragües, 1989)

VI.2. MATERIALES Y MÉTODOS.

Plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) de los clones SOM-1, 05 y 50, procedentes de cultivo in vitro, se trasplantaron siguiendo la técnica de Cantos et al., (1993), a contenedores de plástico de 1,5 litros de capacidad usando como sustrato 900g del horizonte Ap de un suelo agrícola, cuyas características principales se indican en la tabla 18. Este suelo se esterilizó mediante autoclavado a 121 °C y vapor fluyente en tres sesiones de 1 hora diaria. Cada contenedor se regó hasta saturación con solución Hoagland al 20 % y se cubrió con una bolsa de plástico transparente en cuyo interior se pulverizó agua destilada para dar mayor humedad. Los contenedores con las plántulas se colocaron en una cámara de cultivo a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, con un fotoperiodo de 16 horas, e intensidad lumínica de $111 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, permaneciendo en estas condiciones durante 8 días.

Finalizado este periodo de adaptación, las plantas se llevaron a un invernadero para su aclimatación, donde las bolsas de plástico se fueron abriendo gradualmente, cortando primero una de sus esquinas y más tarde la otra.

Transcurridos 10 días, se comenzaron a eliminar totalmente las bolsas de plástico de aquellos contenedores en los que no se observaba la formación de gotas de agua.

Durante los 15 días que duró este periodo de aclimatación, se regó con solución Hoagland al 20 % a intervalos de 5 días. A continuación, las plantas supervivientes de cada clon se repartieron aleatoriamente en tres grupos correspondientes a los tres tratamientos salinos en estudio: solución Hoagland al 20 % (tratamiento control), solución Hoagland al 20% a la que se añadieron 4 g l^{-1} de NaCl y solución Hoagland al 20 % a la que se añadieron 8 g l^{-1} de NaCl (tabla 17).

La adición de NaCl fue progresiva, prolongándose este periodo de salinización durante 10 días con riegos cada 2 días, e incrementando la concentración salina en 2 g l^{-1} de NaCl por riego, hasta alcanzar la concentración prevista en cada grupo de plantas. En ese momento, se realizó un nuevo conteo de plantas de cada clon y se consideró como comienzo de la prueba. Después, las plantas pertenecientes a cada tratamiento salino

siguieron recibiendo las cantidades de NaCl que le correspondían hasta los 50 días de duración del ensayo. Al finalizar éste, se determinó el peso fresco y seco de un número significativo (ver tabla 20) de las plantas supervivientes. La determinación del peso seco se realizó secando el material en estufa de aire forzado a 70°C hasta peso constante. El material vegetal seco, se molió en mortero para su análisis químico, en el que se emplearon los métodos en uso en el IRNAS-CSIC. La determinación de Na, Ca, Mg, K, Fe, Cu, Mn y Zn, se realizó mediante emisión de plasma. El contenido de nitrógeno se analizó mediante digestión Kjeldhal, y el de fósforo por colorimetría, tras la formación del complejo fosfato-vanadato-molibdato. La determinación de cloro se realizó por medio de una calcinación en medio básico para evitar pérdidas de cloruros. La muestra de cenizas se extrajo con agua caliente y el cloro del extracto se determinó colorimétricamente con el método del tiocianato de mercurio en un espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda EZ210.

El sustrato a emplear en la prueba fue analizado previamente siguiendo los métodos de análisis de suelo en uso en el IRNAS-CSIC. Fue secado al aire, molido y tamizado por 2 mm y se le determinaron los siguientes parámetros: textura (método del densímetro de Bouyoucos), pH (en extracto de pasta saturada), carbonatos (calcímetro de Bernard), materia orgánica (método de Walkley y Black), nitrógeno (método Kjeldahl), fósforo disponible (método Olsen), potasio asimilable (fotometría de llama), calcio y magnesio asimilables (absorción atómica), manganeso, hierro, cobre y cinc (absorción atómica), densidad aparente (método del cilindro), densidad real (picnómetro) y potencial capilar (método de Richards).

Al finalizar el ensayo se tomaron tres muestras de sustrato de cada tratamiento salino para su análisis. El sustrato fue secado al aire durante 7 días y tamizado a 2 mm. Se tomaron 250 gramos y se realizó un extracto de pasta saturada en donde se determinó la conductividad eléctrica y el pH mediante conductímetro y pH-metro (Crison). En este extracto se determinaron los iones solubles: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . Los cationes cambiables, así como la capacidad de intercambio catiónico, se determinaron mediante extracciones con acetato amónico 1N y pH 7.

El porcentaje de saturación se calculó midiendo la cantidad de agua necesaria para llevar los 250 g de sustrato a saturación.

La temperatura y humedad en el interior del invernadero fue registrada durante todo el ensayo mediante un termohigrógrafo.

El ensayo consistió en un diseño completamente al azar con dos factores; el factor clon, con tres niveles constituidos por los clones SOM-1, 05 y 50, y el factor salinidad también constituido por tres niveles; 0 gl^{-1} , 4 gl^{-1} y 8 gl^{-1} de NaCl en el agua de riego y 16 repeticiones por cada combinación de factores, con un total de 144 contenedores. Los datos estuvieron sometidos a un análisis de la varianza multifactorial (MANOVA) siendo los factores, clon y salinidad, y se empleó el test de rango multiple de Duncan para la separación de medias. En este análisis de datos se utilizó el programa SPSS bajo Windows 10.0. En el estudio de supervivencia se empleó el test-T para diferencias de proporciones mediante un programa realizado en BASIC por este departamento.

VI. 3. RESULTADOS

VI. 3. 1. Efectos sobre el sustrato.

VI.3.1.1. Características de las soluciones nutritivas empleadas en los tratamientos.

Como disolvente de las sales nutritivas se usó agua de la red de Sevilla capital, con una conductividad eléctrica (CE) de 0,2 dS m^{-1} , lo que significa que es un agua de muy bajo contenido en sales, perfectamente utilizable para beber y para regar.

Tabla 17. Composición de las distintas soluciones empleadas para riego.

			Tratamiento		
			Control	Solución N°1	Solución N°2
KNO ₃	gl^{-1}		20,2	20,2	20,2
NH ₄ H ₂ PO ₄	gl^{-1}		23	23	23
MgSO ₄ · 7H ₂ O	gl^{-1}		49,3	49,3	49,3
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	gl^{-1}		34,8	34,8	34,8
Quelato de hierro	%		0,5	0,5	0,5
H ₃ BO ₃	mg l^{-1}		0,572	0,572	0,572
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	mg l^{-1}		0,362	0,362	0,362
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	mg l^{-1}		0,044	0,044	0,044
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	mg l^{-1}		0,016	0,016	0,016
H ₃ MoO ₄ · H ₂ O	mg l^{-1}		0,004	0,004	0,004
NaCl	gl^{-1}		0	4	8
	mM		0,0	68,4	136,8
C.E.	dS m^{-1}		0,46	7,51	14,4
SAR			0	62	124

En la tabla 17 se indica la composición química de cada uno de los tratamientos.

Dado que todas las plantas recibieron el mismo número y cantidad de riegos, se les aportó la misma cantidad de nutrientes excepto Na^+ y Cl^- .

El tratamiento control tuvo una conductividad eléctrica de $0,46 \text{ dS m}^{-1}$ lo que significa un nivel pequeño de salinidad que no afecta al desarrollo normal de una planta. La U.S.S.L. (United States Salinity Laboratory, 1969) clasifica esta agua como C.2. S.1. y se le calculó una presión osmótica de $-0,17$ bares.

En el primer tratamiento se añadieron a la solución control 4 g l^{-1} ($68,4 \text{ mM}$) de NaCl , lo que elevó la conductividad eléctrica a $7,54 \text{ dS m}^{-1}$ y el SAR a 62. En este caso, el agua se clasifica como C.4.S.4. y se le calculó una presión osmótica de $-2,75$ bares. Según los datos indicados la solución se puede considerar como bastante salina no utilizable para riegos salvo en casos excepcionales.

En el segundo tratamiento se añadieron a la solución base 8 g l^{-1} ($136,8 \text{ mM}$) de NaCl , lo que provocó un incremento de la conductividad eléctrica a $14,4 \text{ dS m}^{-1}$ y del SAR a 124,1, valores que se salen completamente de la tabla de clasificación del U.S.S.L. La presión osmótica calculada fue de $-5,25$ bares. Una solución nutritiva de estas características no debe ser utilizada para el cultivo de plantas en condiciones normales y se usó en el presente trabajo para provocar una situación de exceso de sal.

VI.3.1.2. Influencia de los tratamientos salinos sobre el sustrato.

En la tabla 18 se indican las características físicas y químicas del suelo usado como sustrato. Se trata de un suelo franco arenoso, con una densidad aparente adecuada y una cantidad de agua útil de $0,05 \text{ cm}^3$ de agua por cm^3 . Ligeramente alcalino y con una conductividad eléctrica de $2,29 \text{ dS m}^{-1}$ medidos en extracto de pasta saturada. Los contenidos de materia orgánica y de nitrógeno son bajos estableciéndose una relación C/N de 7,8. Este valor es muy bajo y propio de suelos erosionados, agotados y excesivamente labrados, donde el proceso de nitrificación ha sido muy intenso, observándose un contenido en nitrógeno en forma nítrica de 54 mg Kg^{-1} , que es considerado normal.

Este suelo tiene un nivel alto en fósforo asimilable, normal en potasio y bajo en calcio y magnesio. Los contenidos de micronutrientes son adecuados.

En términos de fertilidad actual, los contenidos encontrados en la solución del suelo son bajos para todos los elementos analizados, mientras que los observados en el

complejo de intercambio catiónico (fertilidad potencial) son adecuados para calcio y elevados para magnesio, sodio y potasio.

Tabla 18. Características físicas y químicas del sustrato.

	Arena	%	75,8
Textura	Limo	"	8
	Arcilla	"	16,2
Densidad aparente.		g/cc	1,37
Densidad real		"	2,62
Potencial capilar	1/3	atm	13,8
	15	"	10,1
Porosidad total		%	47,9
pH			7,45
carbonatos		%	<1
Materia orgánica		"	0,8
N(total)		"	0,03
C/N			7,8
N-NO ₃		mg Kg ⁻¹ de suelo	54
Fósforo		"	16
Potasio		"	199
Calcio		"	161
Magnesio		"	113
Manganeso		"	23
Hierro		"	20
Cobre		"	9
Cinc		"	50

La adición de las diferentes soluciones salinas a este sustrato modificó la C.E. el SAR , PSI y presión osmótica de la solución del suelo (extracto de pasta saturada) (Tabla 19).

La aplicación de riegos con las cantidades de NaCl antes mencionadas dio lugar a un aumento de la conductividad eléctrica del extracto de pasta saturada del suelo a 10,53 y 17,5 dS m⁻¹ para los tratamientos de 4 y 8 g l⁻¹ respectivamente. Este aumento de la salinidad produjo un aumento de las concentraciones de calcio, magnesio, sodio y potasio en la solución del suelo, aunque este aumento fue más importante en el ión sodio.

Asimismo, la mayor proporción del ión sodio en la solución del suelo tuvo como consecuencia una mayor adsorción de éste en el complejo de intercambio catiónico y consiguiente salida de los cationes calcio y magnesio.

Tabla 19. Influencia de los tratamientos sobre la salinización del sustrato.

Extracto de pasta		Tratamiento		
		0 gl⁻¹ NaCl	4 gl⁻¹ NaCl	8 gl⁻¹ NaCl
CE (extracto)	dSm ⁻¹	2,3	10,5	17,5
SAR		1,3	12,1	16,4
PSI		0,68	14,2	18,6
P. Osmótica	atm	-0,83	-3,8	-6,4
Cambiables				
	meq/100 g			
CIC	"	7,5	7,3	7
(Ca + Mg)	"	6,82	4,76	1,98
K	"	0,49	0,42	0,43
Na	"	0,19	2,12	4,6
Solubles				
	meq l ⁻¹			
Ca	"	16,5	35,6	54,3
Mg	"	5,1	11,2	15,4
K	"	0,98	1,3	1,6
Na	"	4,4	58,8	96,9
Total	"	26,98	106,9	168,2

Los riegos en el tratamiento de 4 gl⁻¹ de NaCl produjeron un PSI de 14,3 y una conductividad eléctrica de 10,5 dS m⁻¹ pudiendo clasificar este suelo de salino.

En el tratamiento de 8 gl⁻¹ de NaCl se alcanzó un PSI de 18,7 y una conductividad eléctrica de 17,5 dS m⁻¹ siendo este suelo similar a un suelo salino-sódico.

VI. 3. 2. Tolerancia de las plantas de mandioca a la salinidad del medio.

VI.3.2.1. Supervivencia.

Una vez transcurrido el periodo de adaptación de 23 días tras el trasplante de in vitro a ex vitro, en el que se produjeron pérdidas del 23, 11 y 29 % respectivamente para los clones SOM-1, 05 y 50, los distintos grupos de plantas se sometieron a los tratamientos salinos correspondientes (tabla 20).

Durante los 50 días de duración de la prueba, no se produjeron bajas (plantas muertas) en ninguno de los tres clones, con el tratamiento control sin NaCl (tabla 21).

Este hecho es importante para valorar los resultados de la prueba, ya que indicó unas adecuadas condiciones de experimentación y buena aptitud de las plantas, lo que permitió relacionar las pérdidas producidas en los otros tratamientos con la acción de la sal.

fig. 12. Temperaturas máximas, mínimas y medias registradas en el invernadero durante el desarrollo de la prueba.

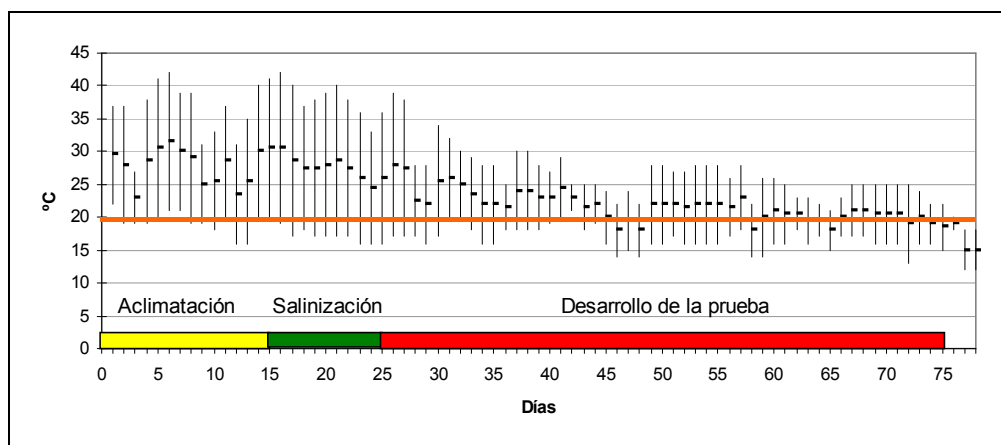


Tabla 20. Número de plantas vivas registradas en cada una de las etapas del proceso desde el trasplante a suelo hasta la finalización del proceso de salinización.

		Clon		
		SOM	05	50
Trasplante:	(0 días)	48 (100) aA	48 (100) aA	48 (100) aA
Adaptación:	(8 días)	40 (83,3) aB	44 (91,6) aB	44 (91,6) aB
Aclimatación:	(15 días)	37 (77,0) aB	43 (89,6) aB	34 (71,0) aC
Salinización:	0 g/l	12 (100)	14 (100)	11 (100)
	4 g/l	12 (100)	14 (100)	11 (100)
	8 g/l	13 (100)	14 (100)	12 (100)

Test T-student para diferencias de proporciones. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre clones (minúsculas) y/o entre etapas (mayúsculas).

Al ser la mandioca un cultivo de clima tropical, las bajas temperaturas influyen mucho sobre su desarrollo y supervivencia. Así, temperaturas por debajo de 20°C frenan su crecimiento y 10°C originan una elevada mortandad entre plantas de mandioca similares a las utilizadas en el experimento. Las temperaturas habidas en el invernadero durante esta prueba (fig. 12) indican que no pudo existir acción negativa importante por parte de este factor climático, lo que también avaló la relación directa entre las bajas producidas y la salinidad.

La adición al medio control de 4 g l^{-1} de sal produjo pérdidas significativas de plantas en los clones SOM-1 y 50 a los 35 días del comienzo de la prueba y en el clon 05 a los 40, para después mantenerse con valores similares hasta el final del

experimento (tabla 21). En ningún caso, se encontraron diferencias significativas entre clones.

Cuando a la solución nutritiva del agua de riego se añadieron 8 gl^{-1} de NaCl, la acción de la sal fue mucho más manifiesta. Como en el caso anterior, no se observaron bajas significativas durante los primeros 30 días de iniciado el experimento. A los 35 días se produjeron pérdidas en todos los clones que fueron pequeñas y no significativas en el clon SOM-1, e importantes y significativas en los otros dos clones. A partir de esa fecha, descendió significativamente el número de plantas vivas del clon SOM-1, aunque quedaron vivas algunas de ellas y murieron todas las plantas de los clones 05 y 50. Es decir, se pudo distinguir entre el comportamiento de 05 y de 50 con pérdidas mayores y más precoces y el clon SOM-1 que soportó mejor la sal.

Tabla 21. Plantas vivas registradas a los 0, 30, 35, 40, 45 y 50 días después de alcanzado el nivel de sal en el agua de riego fijado para el ensayo.

		Concentración de NaCl en el medio		
		0 gl^{-1}	4 gl^{-1}	8 gl^{-1}
0 días	SOM-1	12 (100) aA	12 (100) aA	13 (100) aA
	05	14 (100) aA	14 (100) aA	14 (100) aA
	50	11 (100) aA	11 (100) aA	12 (100) aA
30 días	SOM-1	12 (100) aA	12 (100) aA	13 (100) aA
	05	14 (100) aA	14 (100) aA	12 (85,7) aA
	50	11 (100) aA	11 (100) aA	12 (100) aA
35 días	SOM-1	12 (100) aA	8 (66,6) aB	10 (76,9) aA
	05	14 (100) aA	12 (85,7) aA	3 (21,4) bB
	50	11 (100) aA	7 (63,6) aB	3 (25,0) bB
40 días	SOM-1	12 (100) aA	7 (58,3) bB	6 (46,1) bB
	05	14 (100) aA	12 (85,7) bB	
	50	11 (100) aA	7 (63,6) bB	
45 días	SOM-1	12 (100) aA	7 (58,3) bB	4 (30,7) bB
	05	14 (100) aA	10 (71,4) bB	
	50	11 (100) aA	7 (63,6) bB	
50 días	SOM-1	12 (100) aA	7 (58,3) bB	
	05	14 (100) aA	10 (71,4) bB	
	50	11 (100) aA	7 (63,6) bB	

Test T-student para diferencias de proporciones. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre clones (minúsculas) y/o entre etapas (mayúsculas).

En consecuencia, bajo el punto de vista de la supervivencia de las plantas, los tres clones de mandioca utilizados, soportaron aceptablemente el tratamiento de 4 gl^{-1}

de NaCl en el agua de riego, sin que se pudieran establecer diferencias significativas entre ellos. Este tratamiento, como se indicó antes, tuvo una CE de 7,5 dS/m en el agua de riego y SAR de 62, produciendo en el suelo una CE de 10,5 en extracto de pasta saturada, lo que indica una salinidad elevada. La solución de 8 gl^{-1} de sal con una CE de 14,4 dS/m en el agua de riego y de 17,5 dS/m en extracto de pasta saturada fue excesiva para el nivel de tolerancia de los tres clones de mandioca en consideración, sin embargo permitió distinguir entre ellos definiendo un mejor comportamiento ante la sal y mejor tolerancia del clon SOM.-1.

VI. 3. 2. 2. Desarrollo de plantas supervivientes.

Como medida del desarrollo de las plantas supervivientes de cada tratamiento y clon, se eligió el peso fresco y seco de ellas, representado por el de la media en cada caso. A partir de estas magnitudes se calculó además el tanto por ciento de agua en los tejidos. ($\{(Pf-Ps)/Pf\} \cdot 100$).

Tabla 22. Influencia de la salinidad sobre el peso fresco (en mg) de raíz, tallo, hojas y planta completa en los tres clones de mandioca (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 gl^{-1}).

<u>Organo</u>	<u>Clon</u>	<u>Salinidad (gl^{-1} NaCl)</u>					
		0		4		8	
Raíz	SOM-1	100,0	a B	196,0	a B	380,0	A
	05	84,5	a B	188,9	a A	176,0	AB
	50	56,4	a B	195,6	a A	172,0	A
	Media	80,3	B	193,5	A		
Tallo	SOM-1	983,8	a A	738,0	a A	773,0	A
	05	648,8	b A	425,0	b A	359,0	A
	50	440,8	b A	485,6	b A	333,0	A
	Media	691,1	A	549,5	A		
Hojas	SOM-1	1229,2	a A	605,0	a B	438,0	B
	05	987,6	a A	341,7	a B	166,0	B
	50	726,9	a A	444,4	a AB	121,0	B
	Media	981,2	A	463,7	B		
Planta	SOM-1	2313,1	a A	1538,8	a A	1591,0	A
	05	1720,9	ab A	955,6	a B	701,0	B
	50	1204,0	b A	1125,6	a A	626,0	A
	Media	1746,0	A	1206,6	B		

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan.

La presencia de NaCl en el sustrato influyó negativamente sobre el peso fresco de los órganos aéreos y en el total de las plantas, aunque con diferencias entre clones. El clon 05 fue el más claramente afectado ya que fue el de más biomasa en el tratamiento control y el de menos en cada uno de los tratamientos salinos. Después el clon 50 el de menor peso fresco en el tratamiento control, resistió bien el tratamiento con la concentración menor de NaCl pero se afectó fuertemente cuando se añadieron al medio nutritivo 8 gl^{-1} de la sal (tabla 22).

Tabla 23. Influencia de la salinidad sobre el peso seco (en mg) de raíz, tallo, hojas y planta completa en los tres clones de mandioca (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 gl^{-1}).

<u>Organo</u>	<u>Clon</u>	Salinidad (gl^{-1} NaCl)					
		0		4		8	
Raíz	SOM-1	50,3	a A	42,1	a A	69,4	A
	05	33,3	a A	44,4	a A	20,8	B
	50	24,0	a B	36,5	a A	28,5	AB
	Media	35,8	A	41,0	A		
Tallo	SOM-1	208,7	a A	126,1	a A	150,6	A
	05	103,1	b A	79,0	a A	58,7	A
	50	59,5	b A	77,1	a A	61,2	A
	Media	123,8	A	94,1	A		
Hojas	SOM-1	205,0	a A	132,2	a A	229,9	A
	05	164,6	ab A	85,4	a B	107,5	B
	50	107,5	b A	94,6	a A	85,7	A
	Media	159,0	A	104,1	B		
Planta	SOM-1	464,0	a A	314,2	a A	436,3	A
	05	301,0	ab A	208,9	a A	152,6	A
	50	181,3	b A	208,1	a A	191,0	A
	Media	315,4	A	243,7	A		

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan

Al igual que ocurrió con la supervivencia de las plantas, el clon de mandioca SOM-1 fue el menos afectado en su desarrollo por la presencia de sal en el medio. El peso fresco de las plantas sometidas a la salinidad, en especial las que recibieron mayores concentraciones de NaCl fue netamente superior al de los otros clones.

Por el contrario, las raíces de las plantas tratadas con NaCl tuvieron mayor peso fresco que las del control.

El peso seco de las plantas completas de mandioca no se vio significativamente afectado por la salinidad y sólo el peso seco de las hojas en plantas del clon 05 disminuyó significativamente en el tratamiento de 4 gl^{-1} (tabla 23).

Las diferencias entre clones observadas en el tratamiento control principalmente obedecen al mayor peso en raíces tallo y hojas del clon SOM-1 frente a los otros clones.

Como consecuencia de lo indicado para peso fresco y seco, el grado de hidratación se vió afectado por la salinidad en la raíz y hojas de manera opuesta (tabla 24). En la raíz aumentó conforme aumentó la salinidad del sustrato, mientras que en las hojas se produjo un descenso ($P < 0,01$). No obstante, esta pérdida de agua fue inferior en el clon SOM-1, precisamente aquel de mejor comportamiento ante la sal. Existió en consecuencia una gran semejanza de la influencia de la sal sobre el grado de hidratación de los tejidos de la planta cultivada in vitro y en invernadero, ya que en ambos casos afectó principalmente a la hoja.

Tabla 24. Influencia de la salinidad sobre el grado de hidratación de raíz, tallo, hojas y planta completa en los tres clones de mandioca (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 gl^{-1}).

<u>Organo</u>	<u>Clon</u>	Salinidad (gl^{-1} NaCl)					
		0		4		8	
Raíz	SOM-1	50,1	a B	77,6	a A	79,4	A
	05	61,0	a C	75,0	a B	88,9	A
	50	57,2	a B	79,7	a A	80,5	A
	Media	56,1	B	77,4	A		
Tallo	SOM-1	80,0	b A	83,3	a A	79,9	A
	05	84,0	ab A	82,0	a A	81,9	A
	50	87,3	a A	81,8	a A	78,2	A
	Media	83,8	A	82,4	A		
Hojas	SOM-1	81,0	a A	67,6	a AB	44,8	B
	05	82,6	a A	63,9	a B	29,9	C
	50	85,5	a A	69,1	a A	26,2	B
	Media	83,1	A	66,9	B		
Planta	SOM-1	80,3	b A	79,7	a A	70,7	B
	05	82,2	ab A	76,8	a AB	70,8	B
	50	85,6	a A	78,4	a AB	68,6	B
	Media	82,7	A	78,3	A		

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan

La altura de las plantas supervivientes no se vio muy afectada por la salinidad en ninguno de los clones siendo muy similar entre ellos (fig. 13). Se observó un crecimiento rápido hasta los 25 días coincidiendo con el inicio de los tratamientos salinos, seguido de un crecimiento lento hasta el final del ensayo. Este crecimiento lento también se observó en las plantas del tratamiento control y por lo tanto no es achacable al efecto de la salinidad sino más bien al tamaño limitado del contenedor. También pudo influir el que en este tiempo las plantas soportaron temperaturas más bajas. No obstante, como se indicó antes nunca descendieron a niveles peligrosos.

El inicio de los tratamientos salinos detuvo la formación de nuevas hojas en la planta manteniendo el número de ellas hasta los 55 días en el tratamiento de 4 gl^{-1} para iniciar una defoliación hasta el final del ensayo. La defoliación comenzó a los 30 días en el tratamiento de 8 gl^{-1} (fig. 13).

El número de yemas tampoco experimentó cambios significativos con la salinidad y sólo se observaron diferencias significativas entre clones ($P < 0,01$) en el tratamiento de 4 gl^{-1} donde el clon SOM-1 continuó formando yemas mientras que los clones 05 y 50 no (fig. 13).

Tabla 25. Longitud, número de hojas y superficie foliar. en los tres clones de mandioca (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 gl^{-1}).

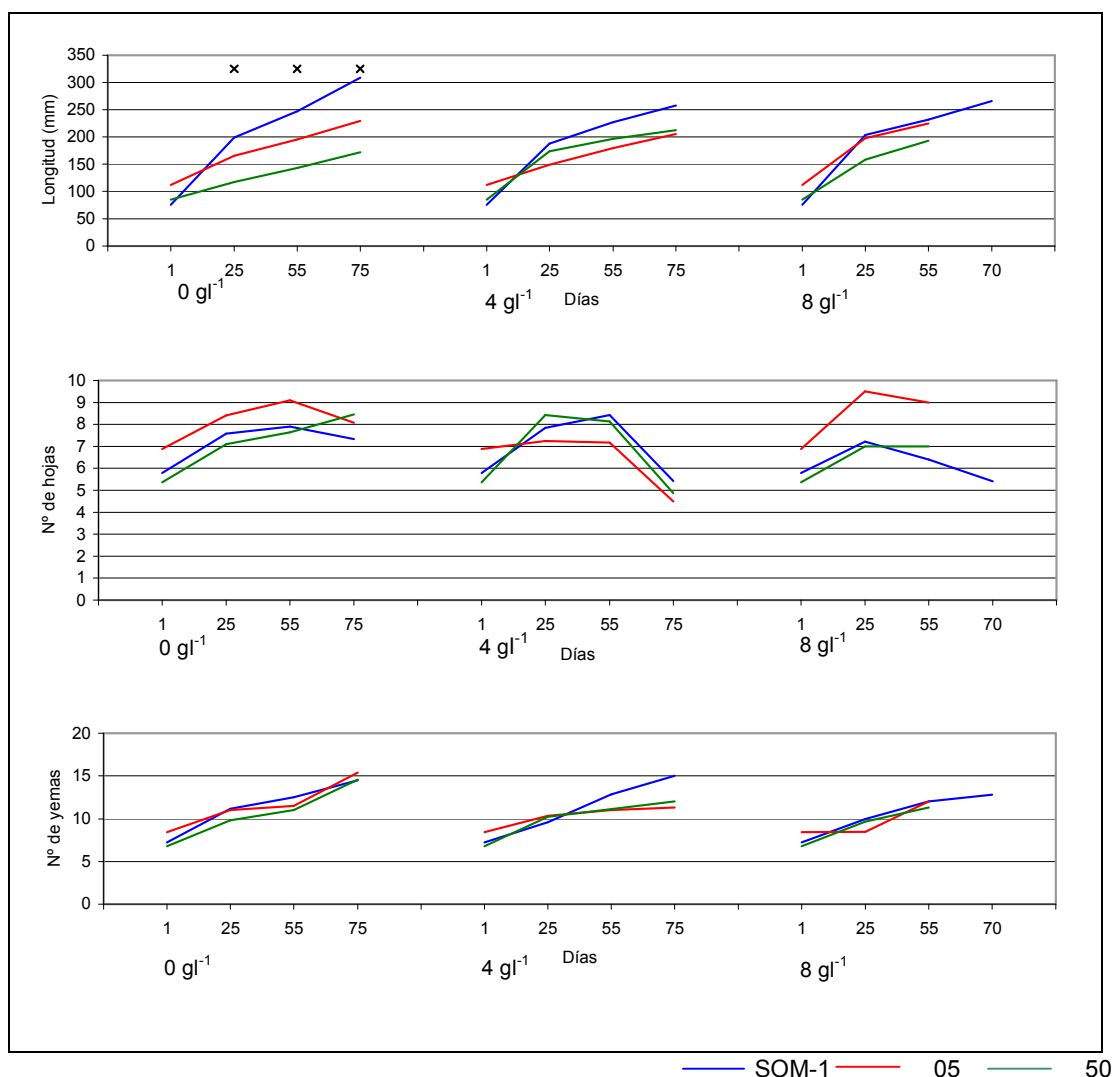
		Salinidad (gl^{-1} NaCl)								
	Clon	0			4			8		
Altura (mm)	SOM-1	308	a	A	258	a	A	266	A	
	05	230	ab	A	206	a	A	236	A	
	50	172	b	A	213	a	A	220	A	
	Media	236,7		A	225,5		A			
Nº hojas	SOM-1	7	a	A	5	a	A	6	A	
	05	8	a	A	4	a	A	5	A	
	50	8	a	A	4	a	A	6	A	
	Media	8,1		A	4,7		B			
Area foliar (mm^2)	SOM-1	11380	a	A	7693	a	A	7981	A	
	05	10058	a	A	5210	a	A	4409	A	
	50	7562	a	A	4718	a	A	6210	A	
	Media	9666,7		A	5873,7		B			

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. test de rango múltiple de Duncan.

En resumen, la longitud de las plantas no se vio afectada por la salinidad en ninguno de los clones si bien el clon SOM-1 fue el de mayor longitud al finalizar el ensayo en el tratamiento control.

El número de hojas fue menor en los tratamientos de 4 y 8 gl^{-1} con respecto al tratamiento control, lo cual se tradujo en un descenso de la superficie foliar en estos mismos tratamientos de manera similar en los tres clones (tabla 25).

fig 13. Longitud del tallo, número de hojas y número de yemas observadas en las plantas durante el desarrollo de la prueba.



Los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,01$) entre clones según el test de Duncan.

VI. 3. 2. 3. Producción relativa.

En la fig. 14 se observa el peso fresco relativo en plantas de los clones SOM-1, 05 y 50 en los tres tratamientos salinos. En el tratamiento de 4 gl^{-1} el peso fresco

relativo de los tres clones se mantuvo por encima del 50 % destacando el clon 50 que experimentó un menor descenso. Con el aumento de la salinidad a 8 g l^{-1} en el agua de riego, el clon 05 disminuyó su peso fresco hasta el 41 % mientras que el clon 50 lo hizo hasta el 52 %. El clon SOM-1 no experimentó variaciones en este tratamiento salino.

Por lo tanto, sólo el clon 05 disminuyó su peso fresco relativo por debajo del 50% en el tratamiento de 8 g l^{-1} , mientras que los clones SOM y 50 mantuvieron este valor por encima de este nivel pudiendo indicar una mejor tolerancia de estos dos clones a la salinidad del medio.

Con respecto al peso seco relativo (fig. 15) las variaciones observadas en los tres clones fueron muy distintas. La reducción del peso seco relativo en plantas de mandioca con el aumento de la salinidad sólo se produjo en el clon 05 manteniéndose en todo momento por encima del 50 %.

En el clon 50 no se produjo descenso alguno con el aumento de la salinidad del medio, mientras que en el clon SOM-1 se observó una disminución en el tratamiento de 4 g l^{-1} reducción que en el tratamiento de 8 g l^{-1} fue del 6 % del peso seco relativo sólo.

fig 14. Peso fresco relativo en % tomando como referencia el obtenido en el tratamiento control en plantas de los clones SOM-1, 05 y 50. (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 g l^{-1}).

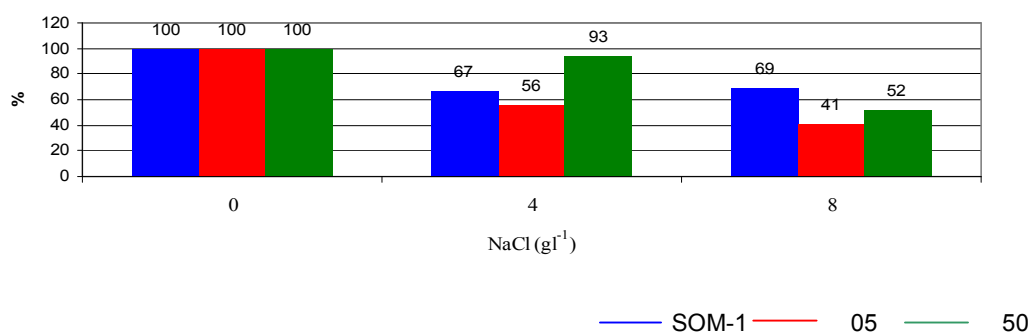
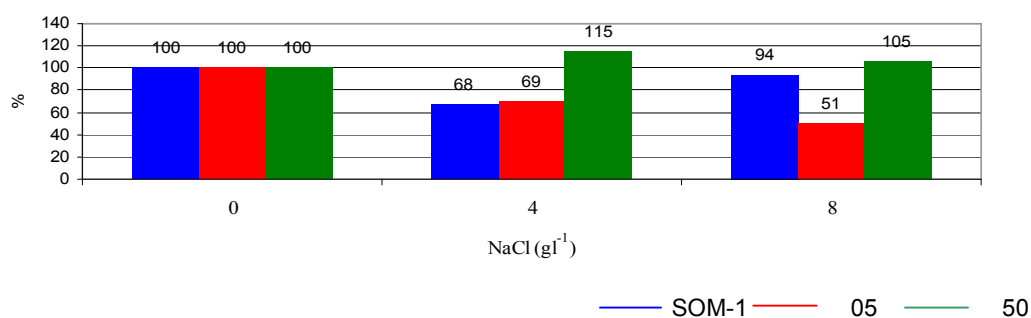


fig 15. Peso seco relativo en % tomando como referencia el obtenido en el tratamiento control en plantas de los clones SOM-1, 05 y 50. (en el clon SOM-1 la medida fue tomada a los 45 días y en los clones 05 y 50 a los 35 días para el tratamiento de 8 g l^{-1}).



VI. 3. 2. 4. Influencia de la concentración de NaCl sobre el contenido de nutrientes en plantas de mandioca cultivadas ex vitro.

VI.3.2.4.1. Nitrógeno.

Sólo existieron algunas diferencias puntuales entre los contenidos de nitrógeno de cada clon, que no se pudieron relacionar con la presencia de sal en el sustrato. Por ello, los comentarios sobre la influencia de sal sobre el nivel de nitrógeno, se realizaron sobre la media de los tres clones (tabla 26).

En la raíz y el tallo se observó una ligera acumulación del nutriente ante la presencia de sal, mientras que en la hoja no se modificó el contenido de nitrógeno. Se puede decir por tanto que la sal influyó muy poco sobre el nivel de nitrógeno en la planta de mandioca.

VI.3.2.4.2. Fósforo.

Como en el caso anterior, tampoco existieron diferencias entre los contenidos de fósforo de los tres clones (tabla 26). Asimismo, también se produjo un ligero aumento del contenido de fósforo al existir sal en el sustrato, lo que al igual que con el nitrógeno, pudo estar influido por un menor desarrollo de la planta.

VI.3.2.4.3 Potasio.

Como en los casos anteriores no se encontraron diferencias entre los contenidos de este nutriente entre los clones estudiados. Por el contrario, la presencia de sal en el sustrato originó algunas modificaciones en los niveles de potasio, pero que no siempre correspondieron a un mismo patrón. Se produjo una fuerte acumulación en la raíz y también aunque poco importante en la hoja. Por el contrario, en el tallo no se encontró ninguna correlación clara entre ambos factores, aunque la mayor concentración de potasio se observó en los tejidos de las plantas control (tabla 27).

VI.3.2.4.4. Calcio.

También los niveles de este nutriente en los tres clones considerados fueron

Tabla 26. Concentración de nitrógeno y fósforo (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 g l⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).

Nitrógeno		Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)					
Organo	Clon	0		4		8	
Raíz							
	SOM	0,902	a B	1,191	a B	2,145	A
	05	0,838	a A	1,418	a A	1,911	A
	50	1,034	a A	1,960	a A	2,117	A
	Media	0,925	B	1,523	A		
Tallo							
	SOM	1,960	a A	2,428	ab A	2,175	A
	05	1,788	a B	2,718	a A	2,495	AB
	50	1,844	a AB	1,663	b B	2,173	A
	Media	1,864	B	2,270	A		
Hojas							
	SOM	4,433	a A	5,003	a A	5,032	A
	05	4,123	a A	3,897	b A	3,875	A
	50	4,097	a A	3,720	b A	3,803	A
	Media	4,218	A	4,207	A		
Planta							
	SOM	2,432	a A	2,874	a A	3,117	A
	05	2,250	a A	2,678	a A	2,427	A
	50	2,325	a A	2,448	a A	2,698	A
	Media	2,336	A	2,667	A		

Fósforo		Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)					
Organo	Clon	0		4		8	
Raíz							
	SOM	0,156	a A	0,136	a A	0,335	A
	05	0,174	a A	0,189	a A	0,182	A
	50	0,202	a A	0,174	a A	0,192	A
	Media	0,177	A	0,166	A		
Tallo							
	SOM	0,073	a A	0,174	a A	0,192	A
	05	0,082	a B	0,111	a AB	0,134	A
	50	0,092	a A	0,095	a A	0,145	A
	Media	0,082	B	0,127	A		
Hojas							
	SOM	0,135	a A	0,118	a A	0,138	A
	05	0,149	a A	0,160	a A	0,142	A
	50	0,146	a A	0,155	a A	0,205	A
	Media	0,143	A	0,144	A		
Planta							
	SOM	0,122	a A	0,143	a A	0,222	A
	05	0,135	a A	0,153	a A	0,153	A
	50	0,147	a A	0,141	a A	0,181	A
	Media	0,134	A	0,146	A		

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. Test de rango múltiple de Duncan.

Tabla 27. Concentración de potasio y calcio (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 gl⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).

Potasio		Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)					
Organo	Clon	0		4		8	
Raíz	SOM	0,494	a B	0,385	a B	1,304	A
	05	0,270	a A	0,355	a A	0,931	A
	50	0,457	a A	1,234	a A	1,505	A
	Media	0,407	A	0,658	A		
Tallo	SOM	1,672	b A	1,104	a A	1,876	A
	05	2,297	ab A	1,208	a B	1,420	B
	50	2,414	a A	1,143	a B	1,320	B
	Media	2,128	A	1,152	B		
Hojas	SOM	2,058	a A	2,100	a A	2,230	A
	05	1,792	a B	1,888	a AB	2,293	A
	50	1,820	a A	1,967	a A	2,140	A
	Media	1,890	A	1,985	A		
Planta	SOM	1,408	a A	1,196	a A	1,803	A
	05	1,453	a A	1,150	a A	1,548	A
	50	1,564	a A	1,448	a A	1,655	A
	Media	1,475	A	1,265	A		
Calcio		Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)					
Organo	Clon	0		4		8	
Raíz	SOM	2,350	a AB	2,522	a A	1,625	B
	05	2,043	a A	2,088	a A	1,858	A
	50	2,277	a A	2,318	a A	1,485	B
	Media	2,223	A	2,309	A		
Tallo	SOM	1,175	b B	2,483	a A	2,698	A
	05	1,712	a A	2,265	ab A	2,355	A
	50	1,443	ab A	1,404	b A	1,903	A
	Media	1,443	B	2,051	A		
Hojas	SOM	2,048	a B	2,750	a A	3,112	A
	05	2,347	a C	2,945	a B	3,512	A
	50	1,808	a C	3,285	a B	3,667	A
	Media	2,068	B	2,993	A		
Planta	SOM	1,858	a B	2,585	a A	2,478	A
	05	2,034	a A	2,433	a A	2,575	A
	50	1,843	a A	2,336	a A	2,352	A
	Media	1,911	B	2,451	A		

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. Test de rango múltiple de Duncan.

bastante parecidos. En la media de ellos, se produjo una acumulación en el tallo, hoja y por ello en el total de la planta ante la presencia de sal, mientras que en la raíz descendió (tabla 27).

VI.3.2.4.5. Magnesio.

Los niveles de este nutriente fueron también similares entre clones y experimentaron un aumento con la salinidad del medio (tabla 28).

VI.3.2.4.6. Sodio.

La concentración de sodio en las plantas de mandioca aumentó en el tratamiento de 4 gl^{-1} y se mantuvo en valores similares en el tratamiento de 8 gl^{-1} , siendo el tallo el principal acumulador de este elemento. La concentración de sodio en la raíz aumentó progresivamente con el aumento de la salinidad (tabla 28) sin que se observaran diferencias entre los clones.

VI.3.2.4.7. Cloro.

La concentración de cloro en la planta aumentó con la salinidad en los tres órganos analizados y principalmente en tallo y hojas. En la raíz la concentración de cloro aumentó bastante entre el testigo y el tratamiento de 4 gl^{-1} y algo menos entre este y el tratamiento de 8 gl^{-1} (tabla 29).

VI.3.2.4.8. Micronutrientes .

En los micronutrientes considerados tampoco se encontraron diferencias entre los clones, ni modificaciones ante la presencia de sal (NaCl) en el sustrato que permitieran definir algún tipo claro de influencia de la concentración situación de ésta sobre el nivel de los oligoelementos (tablas 29, 30 y 31).

En consecuencia, como en otras situaciones tratadas antes, la mayor influencia sobre el contenido de nutrientes de la planta de mandioca alimentada con solución nutritiva con NaCl, fue la fuerte acumulación de estos elementos (Na^+ y Cl^-). Se observó por ello una alteración importante del equilibrio nutritivo de la planta.

Tabla 28. Concentración de magnesio y sodio (%) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 gl⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).

Magnesio		Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)							
Organo	Clon	0		4		8			
Raíz									
	SOM	0,431	a	B	0,504	a	B	0,685	A
	05	0,345	a	A	0,453	a	A	0,623	A
	50	0,411	a	B	0,525	a	A	0,530	A
	Media	0,396		A	0,494		A		
Tallo									
	SOM	0,127	b	B	0,520	a	A	0,500	A
	05	0,185	ab	B	0,407	ab	A	0,401	A
	50	0,220	a	A	0,223	b	A	0,297	A
	Media	0,177		B	0,383		A	0,399	
Hojas									
	SOM	0,403	a	B	0,464	ab	A	0,519	A
	05	0,400	a	B	0,517	a	A	0,526	A
	50	0,327	a	B	0,442	b	AB	0,482	A
	Media	0,377		B	0,474		A		
Planta									
	SOM	0,320	a	B	0,496	a	A	0,568	A
	05	0,310	a	B	0,459	a	A	0,517	A
	50	0,319	a	A	0,396	a	A	0,436	A
	Media	0,317		B	0,450		A		

Sodio		Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)							
Organo	Clon	0		4		8			
Raíz									
	SOM	0,300	a	C	1,420	a	B	2,536	A
	05	0,254	a	B	1,346	a	A	1,668	A
	50	0,478	a	B	1,559	a	A	1,688	A
	Media	0,344		B	1,442		A		
Tallo									
	SOM	0,129	a	B	5,650	a	A	5,752	A
	05	0,292	a	C	2,878	ab	B	4,085	A
	50	0,314	a	B	2,375	b	A	3,097	A
	Media	0,245		B	3,634		A		
Hojas									
	SOM	0,226	a	B	0,403	a	A	1,112	A
	05	0,274	a	B	0,435	a	A	1,370	A
	50	0,187	a	B	0,683	a	A	1,407	A
	Media	0,229		B	0,507		A		
Planta									
	SOM	0,218	a	B	2,491	a	A	3,133	A
	05	0,273	a	B	1,553	a	A	2,374	A
	50	0,326	a	B	1,539	a	A	2,064	A
	Media	0,272		B	1,861		A		

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. Test de rango múltiple de Duncan.

Tabla 29. Concentración de cloro (%) y cobre (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 gl⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).

Cloro		Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)							
Organo	Clon	0		4		8			
Raíz									
	SOM	0,297	b	C	1,718	b	B	4,052	A
	05	0,353	b	B	2,353	ab	A	1,598	AB
	50	0,768	a	B	3,438	a	A	2,945	A
	Media	0,473		B	2,503		A		
Tallo									
	SOM	0,402	b	C	3,355	a	B	6,153	A
	05	0,686	a	C	4,237	a	B	5,887	A
	50	0,789	a	B	3,897	a	A	4,713	A
	Media	0,626		B	3,829		A		
Hojas									
	SOM	0,363	a	C	3,040	a	B	4,945	A
	05	0,202	a	C	3,118	a	B	4,293	A
	50	0,317	a	C	3,246	a	B	4,463	A
	Media	0,294		B	3,135		A		
Planta									
	SOM	0,354	b	C	2,704	a	B	5,050	A
	05	0,414	b	B	3,236	a	A	3,926	A
	50	0,625	a	B	3,527	a	A	4,041	A
	Media	0,464		B	3,156		A		

Cobre		Salinidad (gl ⁻¹ NaCl)							
Organo	Clon	0		4		8			
Raíz									
	SOM	33	b	B	60	a	A	74	A
	05	36	b	B	52	a	AB	67	A
	50	67	a	A	55	a	A	62	A
	Media	45		B	55		A		
Tallo									
	SOM	18	a	A	22	a	A	24	A
	05	13	a	A	14	a	A	13	A
	50	16	a	A	18	a	A	14	A
	Media	16		A	18		A		
Hojas									
	SOM	18	a	A	14	a	B	16	AB
	05	16	a	A	13	a	A	14	A
	50	13	a	A	16	a	A	15	A
	Media	16		A	14		A		
Planta									
	SOM	23	a	A	32	a	A	25	A
	05	22	a	A	26	a	A	31	A
	50	32	a	A	30	a	A	30	A
	Media	26		A	29		A		

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. Test de rango múltiple de Duncan.

Tabla 30. Concentración de hierro y manganeso (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 g l⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).

Hierro		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)		
Organo	Clon	0	4	8
Raíz	SOM	4132 b AB	5338 a A	3860 B
	05	4315 ab A	5233 a A	5368 A
	50	6221 a A	4494 a AB	4001 B
	Media	4889 A	5022 A	
Tallo	SOM	86 b B	194 a AB	277 A
	05	185 a B	215 a B	330 A
	50	166 a A	181 a A	419 A
	Media	146 A	197 A	
Hojas	SOM	303 a A	289 a A	349 A
	05	257 a B	276 a B	347 A
	50	234 a A	321 a A	344 A
	Media	265 A	295 A	
Planta	SOM	1507 a A	1940 a A	1495 A
	05	1586 a A	1908 a A	2015 A
	50	2207 a A	1666 a A	1588 A
	Media	1766 A	1838 A	
Manganeso		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)		
Organo	Clon	0	4	8
Raíz	SOM	436 a A	708 a A	901 A
	05	526 a A	563 a A	668 A
	50	544 a A	545 a A	654 A
	Media	502 A	605 A	
Tallo	SOM	73 a B	121 a AB	181 A
	05	81 a B	101 a AB	129 A
	50	89 a A	74 a A	104 A
	Media	81 A	99 A	
Hojas	SOM	143 a A	187 a A	247 A
	05	145 a B	239 a A	284 A
	50	174 a B	248 a AB	289 A
	Media	154 B	225 A	
Planta	SOM	218 a A	339 a A	443 A
	05	251 a A	301 a A	360 A
	50	269 a A	289 a A	349 A
	Media	246 A	310 A	

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. Test de rango múltiple de Duncan.

Tabla 31. Concentración de cinc (ppm) en raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones, creciendo en invernadero y sometidos a distintos tratamientos salinos con NaCl (en el tratamiento de 8 g l⁻¹ los datos corresponden a plantas creciendo durante 45 días, para el clon SOM-1 y 35 días en los clones 05 y 50).

Cinc		Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)					
Organo	Clon	0		4		8	
Raíz	SOM	141	a A	213	a A	225	A
	05	133	a B	157	a AB	275	A
	50	252	a A	240	a A	163	A
	Media	176	A	203	A		
Tallo	SOM	99	a A	102	a A	193	A
	05	48	a A	101	a A	98	A
	50	92	a A	122	a A	181	A
	Media	80	A	108	A		
Hojas	SOM	77	a A	82	b A	88	A
	05	80	a AB	63	b B	127	A
	50	55	a B	137	a A	143	A
	Media	71	A	94	A		
Planta	SOM	106	a A	132	a A	168	A
	05	87	a B	107	a AB	166	A
	50	133	a A	166	a A	162	A
	Media	109	A	135	A		

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) en mayúscula y en fila para los tratamientos salinos y en minúscula y en columna para los clones. Test de rango múltiple de Duncan.

VI.4. DISCUSIÓN

Se debe destacar la tolerancia tan distinta ante la sal de la planta de mandioca en condiciones de cultivo in vitro o de invernadero. Como se indicó antes, las plantas cultivadas in vitro sólo soportaron concentraciones salinas inferiores a 2,5 g l⁻¹ de NaCl, lo que demostró cierta sensibilidad a la sal, mayor que la definida para material similar de vid (Troncoso et al, 1999a) o de olivo (Troncoso et al., 1999b). Por el contrario, las plantas de mandioca, mayores, más desarrolladas, en condiciones de invernadero llegaron a soportar durante un cierto tiempo concentraciones de 8 g l⁻¹ de NaCl.

No obstante las diferencias indicadas, existió una correspondencia entre el comportamiento relativo de cada clon in vitro y ex vitro. Así, SOM-1 fue el que demostró mayor tolerancia a la sal en ambas situaciones como corresponde a una especie recogida en el desierto árido-salino de Somalia. Por el contrario, 05 fue el clon que demostró mayor sensibilidad de acuerdo también con su origen de la zona tropical

lluviosa de las antiguas colonias francesas de Africa Occidental. Además, tanto in vitro como en el invernadero, cada uno en su nivel, la sal ejerció los mismos efectos sobre la planta de mandioca. Cuando la concentración fue suficientemente elevada provocó la muerte de algunas plantas y disminuyó el desarrollo (peso fresco, peso seco, crecimiento, formación de yemas y de hojas) de las supervivientes. También en ambos casos (in vitro y ex vitro), la presencia de sal en el medio disminuyó el contenido de agua de las hojas en aquellos clones tolerantes, y provocó una fuerte acumulación de Na^+ y Cl^- en los tejidos de la planta. El primer efecto, concuerda con lo indicado en la bibliografía sobre la acción de la sal sobre la presión osmótica medio-planta, que se considera como la acción más inmediata de la sal sobre la planta (Munns, 1993). El hecho de que la falta de agua aparezca primero en la hoja coincide con lo indicado por Newman (1997) sobre que la acumulación de sal se manifiesta con un proceso de senescencia foliar que impide nuevos crecimientos de la planta. Munns et al., (1995), también indicaron que la afectación foliar fué determinante para medir la tolerancia de la planta a la salinidad y Franco et al., (1997), relacionaron la variación del área foliar con la tolerancia a la sal.

El otro rasgo característico de la presencia de NaCl en el medio, es la modificación de la composición mineral de la planta, en especial la acumulación de Na^+ y Cl^- . Este proceso que, como se ha indicado antes, es otra manifestación del efecto tóxico de la sal, que se acepta actúa a más largo plazo que la deshidratación (He y Cramer, 1993), se produjo tanto en las plantas cultivadas in vitro, como en las mantenidas en invernadero. Existió, en consecuencia, un paralelismo entre el comportamiento ante la sal de la planta de mandioca in vitro y ex vitro, aunque a los niveles respectivos de tolerancia indicados antes. Esta relación in vitro-ex vitro de comportamiento ante la sal de la planta de mandioca, ha sido demostrada por primera vez en este trabajo y se considera de gran importancia. En efecto, el uso del cultivo in vitro para la selección de plantas de mandioca tolerantes a la salinidad representa una gran ventaja debido al ahorro de trabajo y tiempo de estos estudios.

VII. EFECTO DE LA MICORRIZA.

VII.1. INTRODUCCIÓN.

Los hongos micorrícicos arbusculares benefician a las plantas, permitiéndoles crecer y producir mejor en suelos de baja fertilidad química. La asociación micorrícica, juega un papel esencial en los ciclos de materia y energía de ecosistemas con suelos generalmente pobres en agua y nutrientes, en especial nitrógeno y fósforo (Read, 1991).

Existen varias razones que justifican este comportamiento entre las que destaca el aumento del volumen de terreno colonizado por la planta, con mayor cantidad de nutrientes disponibles (Clark y Zeto, 2000). También, la mayor captación de nutrientes depende del incremento de la superficie absorbente de la raíz, movilización de fuentes de nutrientes y excreción de compuestos quelantes o ectoenzimas. Autores como Gilmore (1971), Rhodes y Gerdemann (1975), Tinker (1978) y Tinner y Leyder (1978) confirman que la micorriza aumenta el crecimiento de la planta por el aumento de la absorción de nutrientes en especial P, Cu y Zn.

Por regla general, las micorrizas vesículo-arbusculares (MVA) no sólo provocan un incremento en la formación de biomasa, sino que afectan igualmente a la distribución de ésta entre parte aérea y raíz con beneficio relativo del componente autotrófico (Smith 1980).

La competencia entre el hongo y la raíz por los fotosintatos parece ser la principal causa de la mayor relación en peso seco de la parte aérea sobre la raíz que se da en plantas micorrizadas. (Berta et al., 1990; Marschner y Dell, 1994). La formación mantenimiento y función de las micorrizas requiere en torno al 20% de los fotosintatos producidos por la planta (Jacobsen y Rosendahl, 1990).

Algunos investigadores (Allen y Allen, 1986) consideran que la respuesta micorrícica sólo tiene lugar durante periodos de estrés. Varios trabajos llevados a cabo en campo (Davies et al., 1992) demuestran un efecto protector de las micorrizas frente situaciones de estrés tanto biótico como abiótico, que se argumenta en gran parte mediante la estimulación del crecimiento provocado por la micorriza.

Existen estudios que consideran la importancia de la simbiosis MVA en el crecimiento y nutrición de plantas desarrolladas en hábitats salinizados. (Hirrel and Gerdemann, 1980; Pond et al., 1984).

El mecanismo por el que se consigue esta reducción del estrés puede estar relacionado con la mejora en la nutrición fosforada (Hirrel y Gerdemann, 1980; Ojala et al., 1983).

También se ha encontrado un descenso en la concentración de cloro en plantas de *Parthenicum argentatum* micorrizadas cuando crecen en ambientes salinos en comparación con plantas no micorrizadas (Pfeiffer y Bloss, 1988)

El incremento de prolina como consecuencia de la salinidad en lechuga (*Lactuca sativa* L.) fue considerablemente menor en plantas colonizadas por *Glomus fasciculatum* y *Glomus deserticola* que en plantas no inoculadas o inoculadas con *Glomus mosseae*, lo que indicó que las plantas micorrizadas con estos dos hongos estuvieron menos afectadas por la salinidad (Ruíz-Lozano et al., 1996). Estos autores no encontraron diferencias en el contenido de fósforo entre plantas micorrizadas y plantas no micorrizadas con aportes de este nutriente, por lo que sugieren que los mecanismos por los cuales estos hongos alivian el estrés salino pueden estar basados en procesos fisiológicos con un incremento en la tasa de intercambio de CO₂, transpiración, conductancia estomática y eficiencia en la utilización de agua.

Por otra parte, se observó un descenso en la concentración de calcio y magnesio en plantas de alfalfa (*Medicago sativa* L) micorrizadas.

Sin embargo, no todas las MVA aumentan el crecimiento en suelos salinos. (Azcón et al., 1976; Hirrel and Gerdemann, 1980; Rosendahl and Rosendahl, 1991).

La mandioca, como muchas especies tropicales que se cultivan sobre suelos pobres, presenta hábitos micotróficos y un considerable grado de dependencia de la simbiosis planta-micorriza para un desarrollo adecuado (Sieverding, 1991).

Por otra parte, las micorrizas arbusculares juegan un papel decisivo en la aclimatación de plantas micropropagadas (Hooker et al., 1994) entre ellas la mandioca (Azcón-Aguilar et al., 1997).

VII.2. MATERIALES Y METODOS.

En un primer ensayo se estudió el comportamiento de los tres clones de mandioca frente a la micorriza durante el proceso de adaptación y aclimatación desde in vitro a condiciones externas o ex vitro. Para ello, se trasplantaron 12 plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Cranz) de cada uno de los clones SOM-1, 05 y 50 procedentes de cultivo in vitro a contenedores con un sustrato esterilizado en autoclave a

121°C y vapor fluyente durante tres días en sesiones de una hora diaria. La mitad de los contenedores fueron infectados con 5 g de inóculo de *Glomus deserticola* (II Ag 8903), facilitado por la E.E. el Zaidín del CSIC. Después del trasplante, las plántulas se cubrieron con una bolsa de plástico transparente en cuyo interior se pulverizó agua destilada mientras que el sustrato de los contenedores se humedeció con solución Hoagland al 20%. Seguidamente, las plantas se llevaron a una cámara de ambiente controlado para su adaptación a 22 ± 2 °C de temperatura, fotoperíodo de 16 horas por día e intensidad luminosa de $111 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, permaneciendo en estas condiciones durante 8 días. Finalizado este periodo de adaptación, las plantas se llevaron a un invernadero para su aclimatación, donde las bolsas de plástico se fueron abriendo gradualmente, cortando primero una de las esquinas y más tarde la otra. Las plantas se regaron cada 3 días con 100 cc de agua de la red. Cada 7 días se midió la longitud del tallo, el número de yemas y el número de hojas de cada planta. A los 42 días, las plantas fueron retiradas de los contenedores y separadas en raíz, tallo y hojas, pesadas para determinar su peso fresco. La determinación del peso seco se realizó secando el material en estufa de aire forzado a 70°C hasta peso constante.

En un segundo ensayo, se estudió el efecto de la micorriza sobre la tolerancia a la salinidad en plantas de mandioca. Como plantas control, sin micorrizar, se utilizaron las mismas estudiadas en el capítulo anterior dado que ambos experimentos fueron contemporáneos y hechos en el mismo lugar. Para la micorrización de las plantas se siguió el mismo procedimiento de trasplante y adaptación indicado antes, pero inoculando los contenedores respectivos con *Glomus fasciculatum*. La aplicación de la sal se hizo del modo indicado en el capítulo anterior. Una vez finalizado el ensayo, se tomó una muestra de raíces de cada clon y tratamiento salino, que fueron teñidas con azul trypan para observar su estado de micorrización. Para ello, las raíces se depositaron en tubos de ensayo con agua destilada durante 24 horas para su hidratación. A continuación, se lavaron en agua destilada para eliminar los restos de suelo que habían quedado adheridos a ellas. Las raíces lavadas se colocaron de nuevo en tubos de ensayo a los que se les añadió KOH al 10% permaneciendo durante 24 horas en esta solución.

Seguidamente, los tubos con las raíces se autoclavaron durante 20 minutos a 121 °C y 1 atm de presión. Después, se eliminó el KOH y se realizaron 3 lavados con agua destilada dejando finalmente las raíces inmersas en HCl al 5 % durante cinco minutos. A continuación, se eliminó el ácido y se llenaron los tubos con azul trypan al 0,05% en ácido láctico, glicerina y agua (1:1:1) autoclavando nuevamente las muestras

en las mismas condiciones. Finalmente, se eliminó el colorante de cada tubo y se llenaron con glicerol al 50 % durante al menos 3 días. Fragmentos de raíces se montaron en portaobjetos con entellant para su observación en el microscopio óptico.

Los datos fueron analizados mediante la aplicación del test-T para diferencia de medias entre plantas control y micorrizadas. En el estudio de supervivencia se empleó el test-T para diferencias de proporciones mediante un programa realizado en BASIC por este departamento.

VII.3. RESULTADOS

VII.3.1. Efecto de la micorriza en la adaptación y aclimatación de los tres clones de mandioca.

La supervivencia al trasplante desde in vitro a condiciones externas en cámara de cultivo fue muy elevada, prácticamente del 100 %, en todos los casos por lo que no se pudieron establecer diferencias a este respecto entre las plantas tratadas y no tratadas.

Algo similar ocurrió en el segundo periodo de adaptación desde la cámara de cultivo al invernadero por lo que tampoco en este caso existieron diferencias entre los dos grupos de plantas.

Es decir, en el aspecto supervivencia en la adaptación no se pudieron encontrar acciones positivas de la micorriza, porque aquella siempre fue muy elevada.

Por el contrario, la producción de biomasa expresada como peso fresco y peso seco de diferentes órganos de la planta y del conjunto (tabla 32) fue muy superior en las plantas tratadas con micorriza que en las no tratadas. En este experimento, las plantas control del clon SOM-1 tuvieron un mayor desarrollo que la de los otros dos clones considerados y en correspondencia, también las plantas del clon SOM-1 micorrizado con *Glomus deserticola* (II Ag 8903) pesaron mucho más que las correspondientes de los clones 05 y 50. No obstante, el efecto relativo de la mejoría provocada por el tratamiento fue muy parecida en los tres clones obteniéndose un aumento próximo a 13 veces superior en el peso fresco de las plantas tratadas.

El peso seco presentó un comportamiento parecido al indicado para el peso fresco con diferencias muy significativas entre plantas tratadas y no tratadas. No obstante, estas relaciones fueron algo menores que en el peso fresco, lo que determinó un mayor grado de hidratación en las plantas micorrizadas y en especial en su sistema

radical. Este mayor peso de las plantas tratadas con micorrizas frente a las no tratadas se debió a un mayor desarrollo del sistema radicular, diámetro y longitud del tallo y número de yemas y hojas (tabla 33).

Tabla 32. Efecto de la micorriza sobre el peso fresco, seco e hidratación de raíz, tallo, hojas y planta completa de los tres clones de madioca creciendo en invernadero durante seis semanas.

Organo	Clon	Tipo	Peso fresco mg	Peso seco mg	Hidratación %
Raíz	SOM	Control	99	55	44,2
		Micorriza	1659	474	71,6
			**	**	**
	05	Control	37	17	54,2
		Micorriza	529	172	67,4
			**	**	**
	50	Control	32	24	25,2
		Micorriza	360	127	64,7
			**	**	*
Tallo	SOM	Control	948	231	74,9
		Micorriza	14000	2777	80,3
			**	**	
	05	Control	382	77	79,8
		Micorriza	4930	880	81,8
			**	**	
	50	Control	385	102	73,5
		Micorriza	4405	811	81,5
			**	**	
Hoja	SOM	Control	1150	202	82,7
		Micorriza	9727	1937	80,1
			**	**	
	05	Control	332	72	78,3
		Micorriza	4383	844	80,7
			**	**	
	50	Control	343	73	78,7
		Micorriza	5542	962	82,6
			**	**	
Planta	SOM	Control	2197	489	77,6
		Micorriza	25386	5188	79,7
			**	**	
	05	Control	751	166	77,7
		Micorriza	9842	1896	80,6
			**	**	**
	50	Control	760	199	73,8
		Micorriza	10306	1899	81,7
			**	**	**

Diferencias significativas, (*) $P < 0,05$ y (**) $P < 0,01$. Test-T.

Tabla 33. Longitud del tallo, número de hojas, número de yemas y diámetro inferior del tallo de plantas de los tres clones de mandioca creciendo en invernadero durante seis semanas.

Clon	Tipo	Longitud (cm)	n° hojas	n° yemas	Diámetro (mm)
SOM	Control	22	5	15	3
	Micorriza	71	10	20	8
		**	**	*	**
05	Control	16	5	16	2
	Micorriza	44	8	18	5
		**	*	ns	**
50	Control	22	4	14	3
	Micorriza	35	10	19	4
		*	**	ns	*

Diferencias significativas, (*) $P < 0,05$ y (**) $P < 0,01$. Test-T.

En consecuencia, no hubo diferencias entre el desarrollo relativo del sistema radicular y el de la parte aérea. En cualquier caso, la gran diferencia de desarrollo entre las plantas micorrizadas y las no micorrizadas puede confirmar el carácter de micorriza-obligada de la mandioca.

VII.3.2. Influencia de la micorriza sobre la supervivencia de plantas de mandioca sometidas a tratamientos salinos.

En la tabla 34, se compara la supervivencia durante las dos fases de adaptación, después del trasplante desde in vitro a condiciones externas, de las plantas de mandioca micorrizadas con *Glomus fasciculatum* y no micorrizadas, que se estaban preparando para la prueba de salinidad. Como ocurrió en el experimento anterior, el número de bajas fue muy pequeño en todos los casos, lo que no permitió encontrar diferencias significativas entre clones o entre plantas colonizadas o no colonizadas por el hongo.

En la tabla 35, se indica el número de bajas (muertas) de las plantas micorrizadas en relación con los tratamientos salinos y el tiempo, en comparación con las plantas no micorrizadas. En el tratamiento control, sin adición de NaCl, no se produjeron bajas en ninguno de los dos grupos de plantas, lo que, como en casos anteriores, no permitió distinguir entre las plantas con o sin micorriza.

En el tratamiento con 4 gl^{-1} de NaCl tampoco se pudieron hacer distinciones entre las plantas micorrizadas y no micorrizadas.

Tabla 34. Número de plantas micorrizadas y no micorrizadas vivas en cada una de las etapas del proceso de el trasplante in vitro-ex vitro.

		Clon					
		SOM		05		50	
		Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
Trasplante: (0 días)		48 (100)	48 (100)aA ns	48 (100)	48 (100)aA ns	48 (100)	48 (100)aA ns
Adaptación: (8 días)		40 (83,3)	45 (93,7)aA ns	44 (91,6)	48 (100)aA ns	44 (91,6)	48 (100)aA ns
Aclimatación: (15 días)		37 (77,0)	40 (83,3)aB ns	43 (89,6)	43 (89,6)aB ns	34 (71,0)	41 (85,4)aB ns

Test T-student para diferencias de proporciones. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre clones (minúsculas) y/o entre etapas (mayúsculas).

Tabla 35. Número de plantas micorrizadas y no micorrizadas vivas a los 30, 35, 40, 45 y 50 días después de haber iniciado el ensayo de salinización.

		Concentración de NaCl en el medio (gl^{-1})					
		0		4		8	
		Control	Micorriza	Control	Micorriza	Control	Micorriza
0 días	SOM-1	12 (100)	13 (100)aA ns	12 (100)	13 (100)aA ns	13 (100)	14 (100)aA
	05	14 (100)	15 (100)aA ns	14 (100)	15 (100)aA ns	14 (100)	13 (100)aA
	50	11 (100)	14 (100)aA ns	11 (100)	15 (100)aA ns	12 (100)	12 (100)aA
30 días	SOM-1	12 (100)	13 (100)aA ns	12 (100)	13 (100)aA ns	13 (100)	14 (100)aA
	05	14 (100)	15 (100)aA ns	14 (100)	15 (100)aA ns	12 (85,7)	13 (100)aA
	50	11 (100)	14 (100)aA ns	11 (100)	15 (100)aA ns	12 (100)	12 (100)aA
35 días	SOM-1	12 (100)	13 (100)aA ns	8 (66,6)	12 (92,3)aA ns	10 (76,9)	14 (100)aA
	05	14 (100)	15 (100)aA ns	12 (85,7)	15 (100)aA ns	3 (21,4)	12 (92,3)aA **
	50	11 (100)	14 (100)aA ns	7 (63,6)	15 (100)aA ns	3 (25,0)	11 (91,6)aA **
40 días	SOM-1	12 (100)	13 (100)aA ns	7 (58,3)	9 (62,2)bB ns	6 (46,1)	5 (35,7)cB
	05	14 (100)	15 (100)aA ns	12 (85,7)	12 (85,7)aA ns		3 (23,0)bB **
	50	11 (100)	14 (100)aA ns	7 (63,6)	9 (60,0)bB ns		3 (25,0)cB **
45 días	SOM-1	12 (100)	13 (100)aA ns	7 (58,3)	9 (62,2)bB ns	4 (30,7)	5 (35,7)bB
	05	14 (100)	15 (100)aA ns	10 (71,4)	12 (85,7)aA ns		
	50	11 (100)	14 (100)aA ns	7 (63,6)	9 (60,0)bB ns		
50 días	SOM-1	12 (100)	13 (100)aA ns	7 (58,3)	9 (62,2)bB ns		5 (35,7)B
	05	14 (100)	15 (100)aA ns	10 (71,4)	12 (85,7)aA ns		
	50	11 (100)	14 (100)aA ns	7 (63,6)	9 (60,0)bB ns		

Test T-student para diferencias de proporciones. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,01$) entre clones (minúsculas) y/o entre tratamientos (mayúsculas). Diferencias significativas, (*) $P < 0,05$; (**) $P < 0,01$ y ns = no significativas.

Como ocurrió al comparar la tolerancia a la sal en de los clones en el capítulo anterior, el tratamiento con 8 g l^{-1} de NaCl fue el que demostró un mayor poder discriminante.

En los primeros 30 días de experimentación, no se habían producido pérdidas significativas en ninguno de los clones ni grupos de plantas (con o sin micorriza). Tan sólo, como se indicó en el capítulo anterior, murieron las plantas sin micorrizar del clon 05. A los 35 días, como se dijo antes, hubo pérdidas muy importantes entre las plantas no micorrizadas de los clones 05 y 50 y no significativas con fechas anteriores, con el clon SOM-1. La micorriza modificó claramente esta situación. No hubo muertes entre las plantas del clon SOM-1, aunque esto no originó una variación significativa en relación con las pocas bajas indicadas para las plantas sin micorrizar. Este clon definido antes como el más tolerante a la sal, siguió demostrando tal condición. En los otros dos clones y en relación con su menor tolerancia, el efecto de la micorriza fue más importante en la fecha considerada, ya que en las plantas colonizadas por el hongo las pérdidas no fueron significativamente distintas a las de controles anteriores, lo que determinó diferencias altamente significativas con las pérdidas habidas en las plantas no micorrizadas.

En los controles sucesivos aumentaron las pérdidas de plantas en todos los casos, pero se siguió demostrando el mejor comportamiento del clon SOM-1 y el efecto beneficioso de la micorriza.

VII.3.3. Influencia de la micorriza sobre el desarrollo de plantas de mandioca sometidas a tratamientos salinos.

Como medida del desarrollo de las plantas vivas de cada tratamiento salino y clon, se tomó, como en casos anteriores el peso fresco y seco (tabla 36) de cada una de ellas y como consecuencia, el grado de hidratación de sus tejidos. Como en el estudio de la supervivencia (tabla 34), los resultados de las plantas micorrizadas se compararon con los de plantas no micorrizadas en las mismas condiciones.

Aunque en general, el comportamiento de las plantas micorrizadas ante la sal fue parecido al de las no micorrizadas, es decir, la presencia de NaCl en el medio no afectó o benefició al desarrollo radicular pero disminuyó la biomasa de la parte aérea, en todos los casos, el peso fresco de los órganos de las plantas micorrizadas fue superior al equivalente no micorrizado.

Tabla 36. Efecto de la micorriza sobre el peso fresco, seco e hidratación de raíz, tallo, hoja y planta completa de los tres clones de mandioca creciendo en invernadero.

Clon	Organo	Tipo	Salinidad (g l ⁻¹ NaCl)								
			0	4	8	0	4	8	0	4	8
			Peso fresco mg			Peso seco mg			Hidratación %		
SOM	Raíz	Control	100	196	380	50	42	69	50,1	77,8	79,4
		Micorriza	155	194	362	85	43	72	44,8	78,5	79,0
			**			**					
	Tallo	Control	984	738	773	209	126	151	80,0	83,3	80,0
		Micorriza	1902	1041	842	361	185	158	81,1	82,5	81,4
			** *			**					
	Hoja	Control	1229	605	438	205	132	230	81,0	67,7	44,9
		Micorriza	3098	1109	707	499	205	246	83,9	81,2	54,3
			** *			**					
	Planta	Control	2313	1539	1592	464	300	450	80,3	79,7	71,0
		Micorriza	5155	2344	1911	946	433	476	81,7	81,8	73,7
			** *			**					
05	Raíz	Control	85	189	176	33	44	21	61,0	75,0	88,9
		Micorriza	91	252	307	37	41	46	55,7	81,9	83,7
						**					
	Tallo	Control	649	425	359	103	79	59	84,0	82,0	81,9
		Micorriza	881	843	578	157	169	108	83,3	80,9	81,8
			**			** *					
	Hoja	Control	988	342	166	165	85	108	82,6	63,9	30,0
		Micorriza	1612	876	270	248	170	172	84,5	76,4	29,6
			* *			**					
	Planta	Control	1721	956	701	301	209	187	82,2	76,8	70,8
		Micorriza	2583	1971	1156	443	381	326	83,2	80,4	71,7
			** *			** *					
50	Raíz	Control	36	196	172	14	36	29	57,2	79,7	80,5
		Micorriza	64	205	159	29	34	29	50,5	79,3	81,8
						*					
	Tallo	Control	441	486	333	60	77	61	87,3	81,8	78,2
		Micorriza	606	572	358	174	109	63	71,8	83,3	83,4
	Hoja	Control	727	444	121	108	95	86	85,5	69,1	26,2
		Micorriza	1109	578	252	168	110	130	85,8	72,4	31,7
	Planta	Control	1204	1126	626	181	208	175	85,6	78,4	68,7
		Micorriza	1775	1294	769	371	253	222	80,7	79,7	71,3

La presencia del símbolo * indica diferencias significativas $P < 0.05$ y el símbolo ** indica diferencias significativas a $P < 0.01$. Test -T para muestras independientes.

Es decir, la micorriza originó un mayor peso fresco de la planta y un mejor comportamiento de esta ante la sal. Como se indicó antes, también en este caso el clon SOM-1 fue el que demostró mejor aptitud ante la salinidad del medio (tabla 36).

Con el peso seco ocurrió algo parecido, aunque en este caso, no existieron modificaciones importantes en la biomasa radical y los descensos de la parte aérea fueron relativamente más pequeños (tabla 36) que en el peso fresco.

Como con las plantas no micorrizadas, la salinidad del medio hizo disminuir el grado de hidratación de los tejidos de la hoja (tabla 36) de las plantas micorrizadas. No obstante en estas últimas, el descenso fue menor, en especial en el tratamiento de 4 g l⁻¹ de NaCl y en el clon SOM-1.

En consecuencia, la micorriza mejoró la tolerancia a la sal en los tres clones lo que se reflejó en una mayor producción de biomasa y en una mejor conservación de la humedad de los tejidos de la hoja ante una misma concentración de NaCl en el medio.

En lo referente al estado nutritivo, el comportamiento de las plantas micorrizadas ante la sal (tablas 37, 38, 39 y 40) fue muy parecido al indicado antes para las plantas no micorrizadas (tablas 26 a 31), salvo en un mayor nivel de nitrógeno en la raíz de las primeras. Es decir, que también en este caso se produjo una fuerte acumulación de Na⁺ y Cl⁻ en todos los tejidos de la planta por la presencia de sal en el medio. En consecuencia, el mejor comportamiento ante la salinidad de las plantas colonizadas por el hongo no pudo relacionarse con una menor absorción de los iones salinos. La no existencia de diferencias importantes entre el estado de nutrición de las plantas micorrizadas pudo deberse a la aplicación de la solución nutritiva Hoagland (20%) en ambas situaciones que procuró un medio nutritivo suficiente.

Las observaciones realizadas sobre las preparaciones de raíces teñidas con azul trypan revelaron la presencia de formas características de este tipo de micorrización en aquellas plantas micorrizadas con *Glomus fasciculatum* mientras que en las plantas no micorrizadas no se apreciaron estructuras teñidas con dicho colorante. Por ello los efectos diferenciadores descritos se han atribuido a la presencia de hongos MVA en las raíces de las plantas de mandioca micorrizadas (fig.16).

VII.4. DISCUSION

De acuerdo con los resultados indicados antes, la micorriza mandioca-Glomus produjo unos efectos interesantes tanto en el periodo de aclimatación desde el cultivo in vitro al de condiciones de invernadero, como en la respuesta a la salinidad del medio en el último tipo de cultivo.

Tabla 37. Estado de nutrición de la raíz en plantas de mandioca micorrizadas y no micorrizadas de cada clon creciendo en tres concentraciones salinas tras 50 días de cultivo en invernadero.

Clon	Sal	Tipo	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl	Cu	Fe	Mn	Zn
%										ppm			
SOM	0 g l ⁻¹	Control	0,902	0,156	0,494	2,350	0,431	0,300	0,297	33	4132	436	141
		micorriza	2,688	0,176	0,332	2,437	0,444	0,174	0,088	42	1645	356	64
			**					**	*	**	**		**
	4 g l ⁻¹	Control	1,191	0,136	0,385	2,522	0,504	1,420	1,718	60	5338	708	213
		micorriza	2,788	0,154	0,341	2,328	0,376	1,360	1,285	47	2626	330	98
			**				*				**	**	**
	8 g l ⁻¹	Control	2,145	0,335	1,304	1,625	0,685	2,536	4,052	37	3860	901	225
		micorriza	4,595	0,117	1,493	1,353	0,852	2,240	2,888	28	1639	567	98
			**						*	*	**		**
05	0 g l ⁻¹	Control	0,838	0,174	0,270	2,043	0,345	0,254	0,353	36	4315	526	133
		micorriza	1,283	0,157	0,339	2,028	0,377	0,198	0,343	43	1544	241	56
											**	**	**
	4 g l ⁻¹	Control	1,418	0,189	0,355	2,088	0,453	1,346	2,353	52	5233	563	157
		micorriza	2,898	0,175	0,699	2,308	0,496	1,823	1,790	49	2667	363	118
			**		**						**		
	8 g l ⁻¹	Control	0,911	0,182	0,931	1,858	0,623	1,668	1,598	67	5368	668	275
		micorriza	3,722	0,179	1,373	1,883	0,736	3,326	3,930	36	2299	709	103
			*							**	**		**
50	0 g l ⁻¹	Control	1,034	0,202	0,457	2,277	0,411	0,478	0,768	67	6221	544	252
		micorriza	1,875	0,147	0,292	1,920	0,422	0,263	0,388	73	1797	357	100
									*		**	**	**
	4 g l ⁻¹	Control	1,960	0,174	1,234	2,318	0,525	1,559	3,438	55	4494	545	240
		micorriza	2,443	0,195	0,791	2,217	0,537	1,910	2,343	39	2677	240	97
									**		**	**	**
	8 g l ⁻¹	Control	2,117	0,192	1,505	1,485	0,530	1,688	2,945	62	4001	654	163
		micorriza	2,331	0,184	1,921	1,895	0,355	4,556	6,105	40	2354	425	131
							**	*	*		*		
Media	0 g l ⁻¹	Control	0,925	0,177	0,407	2,223	0,396	0,344	0,473	45	4889	502	176
		micorriza	2,054	0,162	0,322	2,172	0,419	0,206	0,246	51	1660	323	72
			**					**	**		**	**	**
	4 g l ⁻¹	Control	1,523	0,166	0,658	2,309	0,494	1,442	2,503	55	5022	605	203
		micorriza	2,700	0,177	0,644	2,279	0,481	1,740	1,871	45	2661	308	105
			**							*	**	**	**
	8 g l ⁻¹	Control	1,724	0,236	1,246	1,656	0,612	1,964	2,865	55	4410	741	221
		micorriza	3,793	0,155	1,531	1,674	0,706	3,138	3,948	34	2046	595	106
			**					**		**	**		**

La presencia del símbolo * indica diferencias significativas $P < 0.05$ y el símbolo ** indica diferencias significativas a $P < 0.01$. Test-T para muestras independientes.

Tabla 38. Estado de nutrición del tallo en plantas de mandioca micorrizadas y no micorrizadas de cada clon creciendo en tres concentraciones salinas tras 50 días de cultivo en invernadero.

Clon	Sal	Tipo	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl	Cu	Fe	Mn	Zn
%										ppm			
SOM	0 g l ⁻¹	Control	1,960	0,073	1,672	1,175	0,127	0,129	0,402	18	86	73	99
		micorriza	1,125	0,082	1,712	1,463	0,150	0,121	0,407	19	107	43	23
			**										*
	4 g l ⁻¹	Control	2,428	0,174	1,104	2,483	0,520	5,650	3,355	22	194	121	102
		micorriza	1,680	0,099	1,015	1,873	0,241	2,675	3,947	16	84	45	23
			*										**
	8 g l ⁻¹	Control	2,175	0,192	1,876	2,698	0,500	5,752	6,153	24	277	181	193
		micorriza	4,080	0,136	1,278	2,193	0,341	4,265	5,187	17	177	53	59
			*										**
05	0 g l ⁻¹	Control	1,788	0,082	2,297	1,712	0,185	0,292	0,686	13	185	81	48
		micorriza	1,723	0,072	1,840	1,324	0,195	0,208	0,627	10	96	59	35
			*										**
	4 g l ⁻¹	Control	2,718	0,111	1,208	2,265	0,407	2,878	4,237	14	215	101	101
		micorriza	1,735	0,097	1,320	1,747	0,238	2,235	4,052	12	124	73	39
			**										*
	8 g l ⁻¹	Control	2,495	0,134	1,420	2,355	0,401	4,085	5,887	13	330	129	98
		micorriza	3,097	0,146	1,642	2,333	0,777	3,802	5,698	14	289	87	47
													**
50	0 g l ⁻¹	Control	1,844	0,092	2,414	1,443	0,220	0,314	0,789	16	166	89	92
		micorriza	2,425	0,101	2,158	1,468	0,284	0,315	0,963	13	192	74	58
	4 g l ⁻¹	Control	1,663	0,095	1,143	1,404	0,223	2,375	3,897	18	181	74	122
		micorriza	2,870	0,128	1,708	1,947	0,294	2,892	4,270	18	179	79	54
			*										
	8 g l ⁻¹	Control	2,173	0,145	1,320	1,903	0,297	3,097	4,713	14	419	104	181
		micorriza	2,740	0,138	1,380	3,700	0,456	5,560	8,667	11	169	86	70
			**										*
Media	0 g l ⁻¹	Control	1,864	0,082	2,128	1,443	0,177	0,245	0,626	16	146	81	80
		micorriza	1,758	0,085	1,903	1,419	0,210	0,215	0,666	14	131	59	39
													**
	4 g l ⁻¹	Control	2,270	0,127	1,152	2,051	0,383	3,634	3,829	18	197	99	108
		micorriza	2,095	0,108	1,348	1,856	0,257	2,601	4,089	15	129	66	39
			**										**
	8 g l ⁻¹	Control	2,281	0,157	1,539	2,319	0,399	4,311	5,584	17	342	138	157
		micorriza	3,419	0,140	1,444	2,551	0,538	4,339	6,087	15	220	73	56
													**

La presencia del símbolo * indica diferencias significativas $P < 0.05$ y el símbolo ** indica diferencias significativas a $P < 0.01$. Test-T para muestras independientes.

Tabla 39. Estado de nutrición de las hojas en plantas de mandioca micorrizadas y no micorrizadas de cada clon creciendo en tres concentraciones salinas tras 50 días de cultivo en invernadero.

Clon	Sal	Tipo	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl	Cu	Fe	Mn	Zn
%										ppm			
SOM	0 g l ⁻¹	Control	4,433	0,135	2,058	2,048	0,403	0,226	0,363	18	303	143	77
		micorriza	3,492	0,226	2,480	2,845	0,423	0,247	0,265	35	290	111	61
			*	**	**	**							
	4 g l ⁻¹	Control	5,003	0,118	2,100	2,750	0,464	0,403	3,040	14	289	187	82
		micorriza	3,210	0,172	2,152	3,258	0,492	0,566	3,505	24	253	217	70
			**	**									
	8 g l ⁻¹	Control	5,032	0,138	2,230	3,112	0,519	1,112	4,945	16	349	247	88
		micorriza	2,693	0,153	2,963	3,413	0,485	1,196	4,465	29	274	218	98
			**		**						*		
05	0 g l ⁻¹	Control	4,123	0,149	1,792	2,347	0,400	0,274	0,202	16	257	145	80
		micorriza	3,462	0,184	1,850	2,825	0,390	0,218	0,130	21	260	130	59
			*			*							
	4 g l ⁻¹	Control	3,897	0,160	1,888	2,945	0,517	0,435	3,118	13	276	239	63
		micorriza	3,440	0,169	1,850	3,145	0,445	0,420	2,770	24	271	186	67
			*										
	8 g l ⁻¹	Control	3,875	0,142	2,293	3,512	0,526	1,370	4,293	14	347	284	127
		micorriza	3,498	0,165	2,667	3,737	0,496	1,358	5,083	30	273	240	80
					*				*		*	**	
50	0 g l ⁻¹	Control	4,097	0,146	1,820	1,808	0,327	0,187	0,317	13	234	174	55
		micorriza	3,458	0,180	1,852	2,810	0,386	0,188	0,245	19	237	164	70
			*			*							
	4 g l ⁻¹	Control	3,720	0,155	1,967	3,285	0,442	0,683	3,246	16	321	248	137
		micorriza	4,398	0,173	1,893	3,627	0,485	0,643	3,858	18	268	203	69
												**	
	8 g l ⁻¹	Control	3,803	0,205	2,140	3,667	0,482	1,407	4,463	15	344	289	143
		micorriza	5,213	0,174	2,507	3,943	0,505	1,487	6,000	15	255	215	69
												*	
Media	0 g l ⁻¹	Control	4,218	0,143	1,890	2,068	0,377	0,229	0,294	16	265	154	71
		micorriza	3,471	0,197	2,061	2,827	0,400	0,218	0,213	25	262	135	63
			**	**	**					*			
	4 g l ⁻¹	Control	4,207	0,144	1,985	2,993	0,474	0,507	3,135	14	295	225	94
		micorriza	3,683	0,171	1,965	3,343	0,474	0,543	3,378	22	264	202	69
			*	*						**			*
	8 g l ⁻¹	Control	4,237	0,162	2,221	3,430	0,509	1,296	4,567	15	346	273	119
		micorriza	3,519	0,162	2,753	3,649	0,493	1,319	5,019	26	270	226	85
			*		**					**	**	**	**

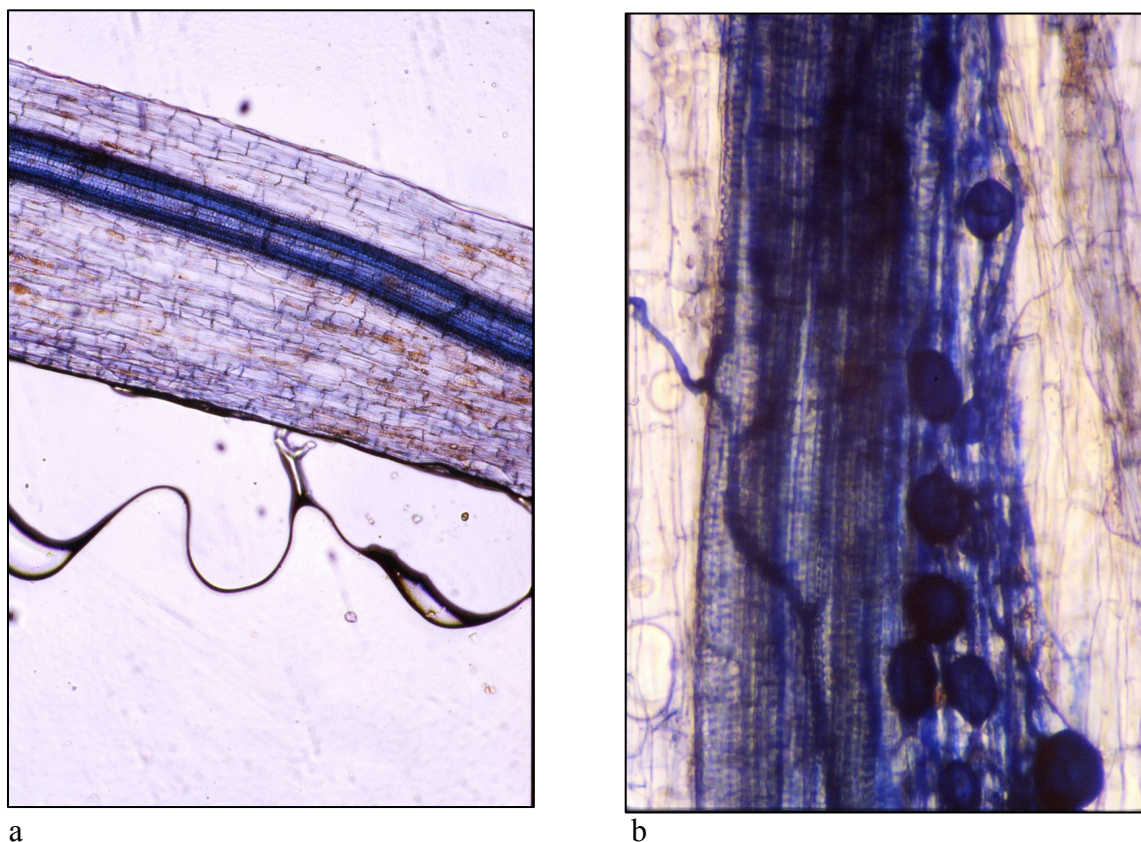
La presencia del símbolo * indica diferencias significativas P<0.05 y el símbolo ** indica diferencias significativas a P<0,01. Test-T para muestras independientes.

Tabla 40. Estado de nutrición de plantas de mandioca micorrizadas y no micorrizadas de cada clon creciendo en tres concentraciones salinas tras 50 días de cultivo en invernadero.

Clon	Sal	Tipo	N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl	Cu	Fe	Mn	Zn
%										ppm			
SOM	0 gl ⁻¹	Control	2,432	0,122	1,408	1,858	0,320	0,218	0,354	23	1507	218	106
		micorriza	2,435	0,161	1,508	2,248	0,339	0,181	0,253	32	681	170	49
			**										
	4 gl ⁻¹	Control	2,874	0,143	1,196	2,585	0,496	2,491	2,704	32	1940	339	132
		micorriza	2,531	0,140	1,273	2,506	0,369	1,556	3,116	27	783	181	59
			**										
	8 gl ⁻¹	Control	3,117	0,222	1,803	2,478	0,568	3,133	5,050	25	1495	443	168
		micorriza	3,789	0,135	1,912	2,320	0,559	2,567	4,180	25	696	279	85
			**										
05	0 gl ⁻¹	Control	2,250	0,135	1,453	2,034	0,310	0,273	0,414	22	1586	251	87
		micorriza	2,265	0,135	1,469	2,063	0,314	0,209	0,369	22	520	131	49
			**										
	4 gl ⁻¹	Control	2,678	0,153	1,150	2,433	0,459	1,553	3,236	26	1908	301	107
		micorriza	2,691	0,147	1,290	2,400	0,393	1,493	2,871	28	1021	207	75
	8 gl ⁻¹	Control	2,427	0,153	1,548	2,575	0,517	2,374	3,926	31	2015	360	166
		micorriza	3,439	0,163	1,894	2,651	0,669	2,829	4,904	27	954	345	77
			**										
50	0 gl ⁻¹	Control	2,325	0,147	1,564	1,843	0,319	0,326	0,625	32	2207	269	133
		micorriza	2,675	0,142	1,577	2,084	0,357	0,255	0,550	30	610	178	73
			*										
	4 gl ⁻¹	Control	2,448	0,141	1,448	2,336	0,396	1,539	3,527	30	1666	289	166
		micorriza	3,237	0,165	1,464	2,597	0,439	1,815	3,491	25	1041	174	73
			**										
	8 gl ⁻¹	Control	2,698	0,181	1,655	2,352	0,436	2,064	4,041	30	1588	349	162
		micorriza	3,428	0,165	1,936	3,180	0,439	3,867	6,924	22	926	242	90
			**										
Media	0 gl ⁻¹	Control	2,336	0,134	1,475	1,911	0,317	0,272	0,464	26	1766	246	109
		micorriza	2,457	0,147	1,517	2,137	0,337	0,214	0,385	28	606	160	57
			**										
	4 gl ⁻¹	Control	2,667	0,146	1,265	2,451	0,450	1,861	3,156	29	1838	310	135
		micorriza	2,831	0,151	1,345	2,501	0,401	1,623	3,161	27	955	188	70
			**										
	8 gl ⁻¹	Control	2,747	0,185	1,669	2,468	0,507	2,524	4,339	29	1699	384	166
		micorriza	3,577	0,152	1,909	2,624	0,579	2,932	5,018	25	845	298	83
			**										

La presencia del símbolo * indica diferencias significativas $P < 0.05$ y el símbolo ** indica diferencias significativas a $P < 0.01$. Test-T para muestras independientes.

fig. 16. Raíz de mandioca sin micorriza (a) (x40) y micorriza (b) con *Glomus fasciculatum* (x100).



Como se indicó en el capítulo anterior, no se encontró una influencia de la micorriza sobre el número de plantas supervivientes de los tres clones de mandioca tras el trasplante desde cultivo in vitro a condiciones externas (invernadero), lo que se debió al bajo número de pérdidas habido en ambos grupos de plantas (con o sin micorriza). No obstante, existen en la bibliografía trabajos que demuestran que cuando el nivel global de supervivencia es más bajo, la micorriza disminuye el número de pérdidas (Hooker et al., 1994).

Por el contrario, la simbiosis mandioca-MVA produjo un incremento muy elevado del peso fresco (13 veces) y seco (10 veces) de la planta de mandioca, durante el periodo de adaptación a condiciones externas, como corresponde a una especie definida como micorriza obligada. Incrementos similares de biomasa de mandioca como consecuencia de la micorriza fueron encontrados por nosotros en experimentos previos (Carretero et al., 1996; Aguilar-Azcón et al., 1997;). En otras plantas también se ha visto un efecto beneficioso de la micorriza sobre el desarrollo (Gianinazzi et al., 1990; Lovato et al., 1996; Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Troncoso et al., 2001).

Al contrario de lo indicado a veces en la bibliografía (Berta et al., 1990; Marschner y Dell, 1994) en las plantas de mandioca consideradas no se observó un mayor desarrollo relativo de la parte aérea sobre la raíz. Este hecho pudo estar relacionado con las buenas condiciones de nutrición a las que las plantas estuvieron sometidas y al mayor grado de hidratación, en especial en la raíz, que origina la micorriza.

Las plantas colonizadas por MVA soportaron mejor la salinidad del medio que las no colonizadas, tanto en la supervivencia como en el mayor desarrollo de las supervivientes. Esta mayor tolerancia a la sal se relaciona con el hecho de que la micorriza produce plantas más fuertes y con un mayor grado de hidratación en especial en las raíces. Por el contrario, no se encontraron diferencias importantes en el estado de nutrición de estos dos tipos de plantas, salvo una mayor acumulación de nitrógeno en la raíz y de fósforo en las hojas raíz de las micorrizadas. Es decir, tanto la mandioca colonizada como la no colonizada por MVA mostraron en sus tejidos cantidades similares de Na y Cl, lo que indicó que el hongo no fue un filtro para la absorción de dichos nutrientes y que las plantas micorrizadas soportaron mejor los excesos de estos elementos. Ruíz-Lozano y Azcón (2000), encuentran que el efecto protector realizado por de *Glomus sp.*, aislado en ambientes salinos, sobre plantas de lechuga sometidas a estrés salino está basado en la estimulación del desarrollo radicular, mientras que el efecto protector de *G. deserticola* estuvo basado en un mejor estado nutricional de la planta.

Numerosos autores han estudiado los beneficios de la micorriza en plantas en situación de estrés abiótico (Howeler et al., 1982; Barea y Jeffries, 1995). Así, Duin et al., (1991) estudiaron las relaciones entre micorrizas, tanto ectomicorrizas como MVA, y diferentes plantas bajo diferentes tipos de estrés como el exceso de metales pesados en el suelo o suelos salinos. Copeman et al., (1996) encontraron que plantas de tomate creciendo bajo condiciones de estrés salino y micorrizadas con MVA presentaron mejor desarrollo que las no micorrizadas.

En los capítulos anteriores, se destacó la mayor tolerancia a la sal del clon SOM-1 de mandioca frente a los otros dos clones estudiados (05 y 50), tanto en condiciones de cultivo in vitro como de invernadero. En este capítulo se ha indicado la influencia positiva de la micorriza al aumentar la tolerancia a la sal de los tres clones. En consecuencia, la combinación SOM-1-hongo MVA resultó muy interesante en este trabajo ya que permite disponer de un material de mandioca de un nivel de tolerancia a

la sal bastante elevado. Este hecho puede ser de gran utilidad para el cultivo de mandioca en zonas árido-salinas donde habitan poblaciones de extrema pobreza y hambruna.

VIII. DESARROLLO IN VITRO Y EX VITRO DE EXPLANTOS-PLANTAS DEL CLON SOM-1 DE MANDIOCA, PROCEDENTES DE PLANTAS MICORRIZADAS Y NO MICORRIZADAS.

VIII.1. INTRODUCCIÓN

La respuesta del material vegetal al cultivo in vitro, depende en gran medida de las condiciones de la cámara (luz, tanto en intensidad como fotoperiodo, y temperatura) y de las características del medio nutritivo. La insuficiencia de mecanismos reguladores, presentes en la planta completa, hace a los tejidos cultivados in vitro muy sensibles a las condiciones nutritivas del medio (Margara, 1988). Además de estos factores externos, también son importantes en el cultivo in vitro las condiciones fisiológicas del material vegetal de partida para la propagación (Margara, 1988; Pierik, 1990).

La diversidad de medios nutritivos existentes para el cultivo in vitro de plantas se explica por la prioridad de atender las necesidades específicas de diferentes tejidos y especies a cultivar y propiciar así su mejor desarrollo. Por ello, junto al uso del medio de cultivo adecuado, es de gran interés la mejora del estado fisiológico del material inicial a propagar. En este sentido Debergh (1986) propone pulverizaciones, baños o inyecciones con reguladores de crecimiento o inmersiones de la planta madre de la que se van a obtener los explantos en soluciones con azúcares, sales minerales o reguladores.

Dado que la micorriza modifica el estado nutritivo (Bolan et al., 1987; Barea, 1991), hídrico (Allen y Cunningham, 1983) y produce cambios en los niveles de reguladores de crecimiento (Crafts y Miller, 1974; Allen et al, 1980; Barea y Azcón-Aguilar, 1982; Bass y Kuiper, 1989; Danneberg et al, 1992) de los tejidos de la planta huésped, se considera de interés estudiar el comportamiento de plantas ya micorrizadas y vueltas a establecer in vitro. Para ello se eligió el clon SOM-1 debido a su comportamiento ante el estrés salino, buena respuesta a la micorrización y al cultivo in vitro que viene presentando a lo largo del presente trabajo.

VII.2. MATERIALES Y METODOS

Los pasos sucesivos del proceso seguido en los ensayos realizados, se indican en el esquema de la fig. 17.

En primer lugar se prepararon 24 explantos nodales de 1 cm de longitud, de plantas del clon SOM-1 no micorrizadas y micorrizadas con *Glomus deserticola* (II Ag 8903), procedentes de la prueba de adaptación referida en el capítulo VII. Estos explantos fueron desinfectados mediante inmersión en etanol 70% durante 15 segundos y en hipoclorito sódico al 12% (50 gl^{-1} de cloro activo) durante 15 o 16 segundos, seguido de tres lavados con agua estéril. A continuación se sembraron individualmente en tubos de 2l x 150 mm con 8 cc de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) con 100 mg l^{-1} de inositol, sin reguladores de crecimiento, en agar 0.6% a pH 5.7. Los tubos, una vez tapados con tapones de polipropileno y sellados con parafilm, se colocaron en una cámara de cultivo a 25 °C, $30 \mu\text{Em}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de iluminación y 16h. de fotoperíodo, distinguiendo entre aquéllos procedentes de plantas no micorrizadas que se señalaron con la letra A y aquellos procedentes de plantas micorrizadas con *Glomus deserticola* (II Ag 8903) que se marcaron con la letra B. Tras 5 ciclos de repicado de 56 días cada uno, se obtuvieron suficientes plantas A y B in vitro para realizar los experimentos que se indican a continuación. A partir de estas plantas se tomaron 24 yemas al azar de cada grupo (A y B) y se sembraron en medio MS igual al indicado anteriormente. Transcurridos 80 días, se extrajeron las plantas de los tubos y se determinó su peso fresco, peso seco, grado de hidratación de los tejidos según la formula; $\{(Pf-Ps)/Pf\} \cdot 100$ y la composición mineral de sus raíces, tallos y hojas como se indicó en el capítulo V (pag. 42).

Otras 32 plantas de cada grupo se trasplantaron a contenedores de 1,5 l de capacidad con suelo, esterilizado como se describe en el capítulo VI (pag. 67). La mitad de los contenedores de las plantas A y B se micorrizaron con *Glomus fasciculatum* formándose en consecuencia cuatro grupos de plantas del clon SOM-1: A (sin micorriza y de origen no micorrizado), A+G.f. (con micorriza y de origen no micorrizado), B (sin micorriza y de origen micorrizado) y B+G.f. (con micorriza y de origen micorrizado).

Todos los contenedores se colocaron en un invernadero para su aclimatación como se describió en el capítulo VI (pag. 67) regándose con solución Hoagland al 20% cada 3 días.

Al cabo de 50 días de cultivo en las condiciones citadas, las plantas fueron retiradas de los contenedores, separadas en raíz, tallo y hojas, determinándose como antes el peso fresco y seco de cada órgano y su composición mineral. Una muestra de raíces de cada grupo de plantas, se coloreó con azul trypan siguiendo el mismo procedimiento descrito en el capítulo VII.

Por último, 8 plantas obtenidas in vitro de SOM-1 A y otras 8 de SOM-1 B se trasplantaron a vasitos de plástico de 250 ml de capacidad, con arena de cuarzo ($\varnothing < 2$ mm) esterilizada en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión, en dos sesiones de 20 minutos de duración cada una. Seguidamente, las plantas se llevaron a una cámara de ambiente controlado para su adaptación a 22 ± 2 °C de temperatura, fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad e intensidad luminosa de $111 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Durante los primeros 30 días, las plantas se regaron con 30 ml de solución Hoagland al 20% cada 4 días. Durante los 12 días siguientes, se regó sólo con agua de la red y a continuación hasta los 70 días sólo se regó cada siete días. En ese momento se sacaron las plantas de sus contenedores respectivos. Se tomaron muestras de raíces de cada grupo de plantas para su tinción con azul trypan como se indicó en el capítulo VII (pag. 92)

Otras muestras de trozos de raíces, tallos y hojas de las plantas de cada grupo cultivado in vitro y ex vitro se fijaron en F.A.A. para su conservación y después ser estudiadas al microscopio. Para ello fueron sometidas al siguiente tratamiento:

- Sumersión durante 24 horas en una mezcla de agua destilada con un 10% de glicerina.
- Evaporación en cápsula de porcelana al baño maría.
- Sumersión durante 24 horas en una mezcla de glicerina y alcohol butílico (3:1).
- Sumersión durante 24 horas en una mezcla de glicerina y alcohol butílico (1:1).
- Sumersión durante 24 horas en una mezcla de glicerina y alcohol butílico (1:3).
- Sumersión durante 24 horas en butílico puro.
- Sumersión en parafina fundida (60° C) durante 24 horas para su inclusión y realización del bloque.

Las piezas incluidas fueron cortadas con un microtomo tipo Minot (Leitz) en secciones tanto transversales como longitudinales de 15 μ de espesor, que se montaron sobre portaobjetos de vidrio impregnados de gelatina de repostería.

Para su coloración, las muestras se rehidrataron mediante el siguiente procedimiento:

Hidratación:

- Xilol: 3 min.
- Xilol: 3 min.
- Xilol: 3 min.
- Etanol 100 %: 2 min.
- Etanol 100 %: 2 min.
- Etanol 96 %: 2 min.
- Etanol 80 %: 2 min.
- Etanol 70 %: 2 min.
- Etanol 50 %: 2 min.
- Agua destilada: 2 min.

Después, una parte de las preparaciones fueron coloreadas mediante la tinción Fucsina-verde-luz y otra parte con azul trypan, siguiendo los siguientes protocolos en cada caso:

a) Tinción con fucsina-verde luz:

- Fucsina Ziehl: 5 min.
- Agua destilada: varias veces
- Verde Luz: 30 s
- Alcohol isopropílico: 1 min.
- Alcohol isopropílico: 5 min.
- Xilol: 5 min
- Xilol: 5 min
- Xilol: 5 min

b) Tinción con azul Trypan

- Celoidina (0,5%(p/v)): 2 s
- Agitar hasta evaporación.
- KOH (1%): 5 min
- Agua destilada: 5 min.
- HCl (0,5%): 1 min.
- Agua destilada: 5 min.
- Azul trypan (0.05%): 10 min.
- Glicerol-agua (50%): varios días
- Etanol 70% : 2 min.
- Etanol 80% : 2 min.
- Etanol 90% : 2 min.
- Etanol 100% : 3 min.
- Xilol: 5 min.
- Xilol: 5 min.
- Xilol: 5 min.

-Montaje: con Entellan (Merck)

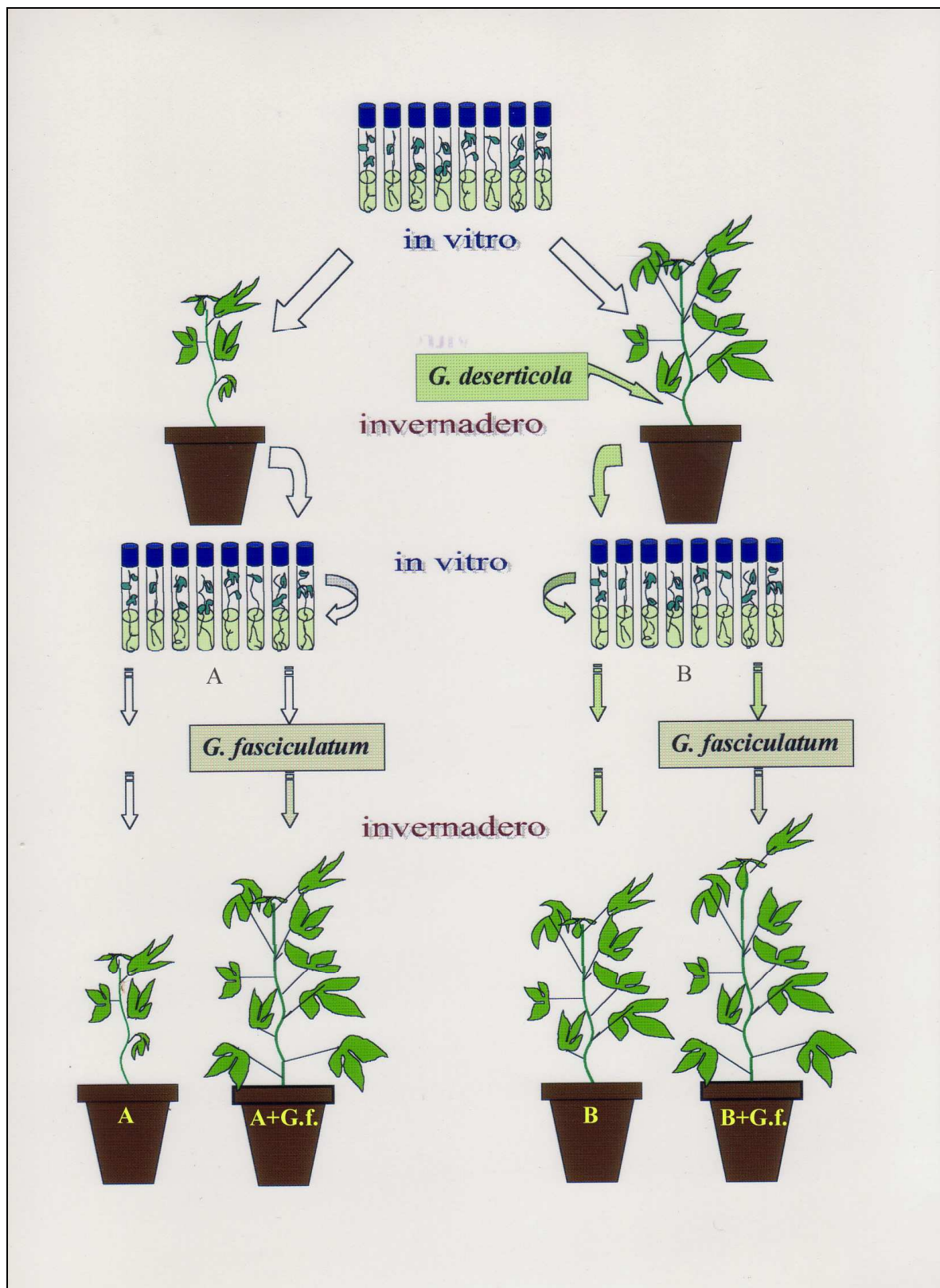


fig 17. Esquema general de los ensayos desarrollados en el capítulo VIII. La letra "A" se aplica a plantas de mandioca que no han estado en contacto con *Glomus deserticola* (IIAg 8903); la letra "B" se aplica a plantas de mandioca que han estado en contacto con *Glomus deserticola* (II Ag 8903). G.f. indica una micorrización con *Glomus fasciculatum*.

Los datos fueron analizados mediante la aplicación del test-T para diferencia de medias entre plantas control y micorrizadas. En el estudio de supervivencia se empleó el test-T para diferencias de proporciones mediante un programa realizado en BASIC por este departamento.

VIII.3. RESULTADOS

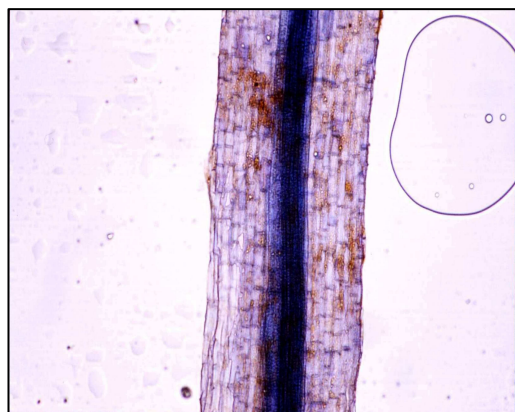
En la figura 18, se observa la diferencia de tamaño tras 30 días de cultivo de las plantas madres, de las que se obtuvieron los explantos, del clon SOM-1 sin micorrizar (A) y micorrizado (B). Como puede apreciarse el efecto de la micorriza es ya patente en este corto periodo de tiempo. En la fig. 19, se observan imágenes de la tinción con azul trypan de las raíces sin micorrizar y micorrizadas con *Glomus deserticola* (II Ag 8903). Detalles más precisos sobre las diferencias de desarrollo final de estos dos grupos de plantas se indicaron en el capítulo VII (tablas 32 y 33) de este trabajo.

fig. 18. Plantas del clon SOM-1 procedentes de cultivo in vitro, no micorrizadas (A) y micorrizadas con *Glomus deserticola* (II Ag 8903) (B) creciendo en invernadero durante 30 días.

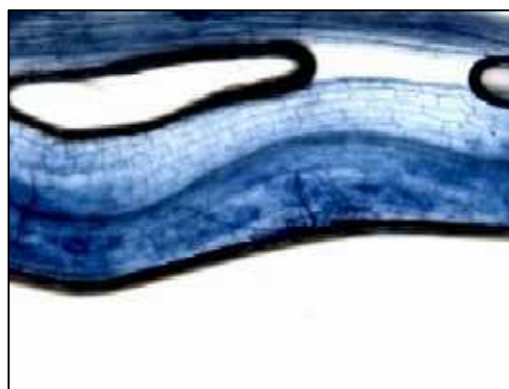


La figura 20 muestra el aspecto de las plántulas de mandioca creciendo durante ocho semanas in vitro en el quinto repicado del material obtenido a partir de las plantas de la figura 18.

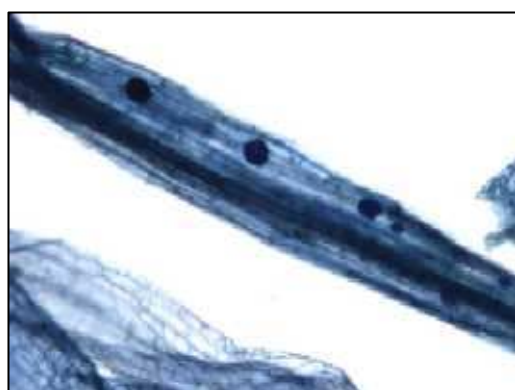
fig. 19. Raíces de mandioca no micorrizadas a (100x) y micorrizada con *Glomus deserticola* (II Ag 8903) b(100x), c (100x), d (200x) e(100x) y f (100x). En a no se observan estructuras teñidas con azul trypan, mientras que en el resto, se observan esporas e hifas características de MVA.



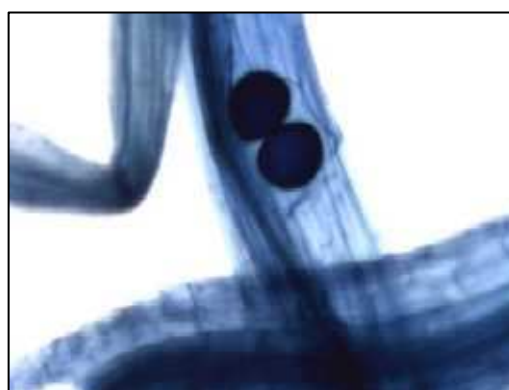
a.



b.



c.



d.



e.



f.

Como puede apreciarse en conjunto, tanto el porte como el aspecto de las plantas de ambos grupos fue similar. En la tabla 41, se presenta la biomasa alcanzada por los explantos del grupo A y del grupo B tras 56 días de cultivo in vitro. No hubo diferencias

significativas en el peso fresco, peso seco y grado de hidratación del sistema radicular de ambos grupos de plantas, aunque las raíces de las plantas A, pesaron más que las del grupo B. Por el contrario la parte aérea (tallo y hojas) de las plantas B (de origen micorrizado) tuvieron un peso fresco y seco significativamente mayor que la de las plantas A (de origen no micorrizado). Como consecuencia de ese comportamiento en cierto modo opuesto, entre el desarrollo del sistema radicular y de la parte aérea de las plantas A y B, no se encontraron diferencias significativas en los pesos del total (planta completa).

fig. 20. Desarrollo in vitro de plántulas de mandioca procedentes de plantas no micorrizadas “A” y procedentes de plantas micorrizadas con *G. deserticola* (II Ag 8903) en medio MS sin reguladores de crecimiento.



Tampoco se encontraron diferencias significativas en el grado de hidratación de los distintos órganos considerados de las plantas A y B.

No se observaron diferencias importantes en el nivel fisiológico ni estadístico entre el estado de nutrición de los órganos respectivos de las plantas A y B (tabla 42).

Tabla 41. Biomasa expresada como peso fresco, peso seco e hidratación de plantas de los tipos “A”(no micorrizadas previamente) y “B”(micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903) del clon SOM-1 de mandioca tras 56 días de cultivo in vitro.

Clon	Organo	Tipo	Peso fresco	Peso seco	Hidratación
			mg	mg	%
SOM-1	Raíz	A	138,3	13,7	90,2
		B	117,8	12,2	89,4
	Tallo	A	91,0	9,3	89,2
		B	123,0	13,2	89,3
			**	**	
		A	129,7	23,0	82,2
	Hoja	B	161,3	26,8	83,6
			**	**	
	Planta	A	358,9	46,0	87,2
		B	402,2	52,2	87,1

Test T para muestras independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas: * (P<0,05); ** (P<0,01)

Tabla 42. Estado nutritivo de la raíz, tallo hojas y planta completa de los tipos “A”(no micorrizadas previamente) y “B”(micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903) del clon SOM-1 de mandioca tras 56 días de cultivo in vitro.

Clon	Organo	Tipo	Composición mineral										
			N	P	K	Ca	Mg	Na	Cl	Cu	Fe	Mn	Zn
			%							ppm			
SOM	Raíz	A	5,227	1,137	4,213	0,437	0,145	0,231	0,951	32	1364	372	320
		B	4,757	0,879	5,197	0,418	0,138	0,190	1,200	33	1370	376	144
	Tallo		*							*			
		A	6,567	1,103	3,730	0,903	0,110	0,899	0,983	28	138	93	174
		B	6,900	1,012	3,437	0,739	0,093	0,596	0,900	23	234	109	97
			*							*			
	Hoja	A	5,337	0,870	2,810	0,818	0,161	0,142	0,147	11	202	292	130
		B	6,097	0,780	2,890	0,725	0,165	0,080	0,206	23	182	288	126
	Planta												
		A	5,710	1,037	3,584	0,719	0,139	0,424	0,694	24	568	252	208

Test-T. Los asteriscos indican diferencias significativas ; * (P<0,05) y ** (P<0,01) entre plantas de tipo A y B.

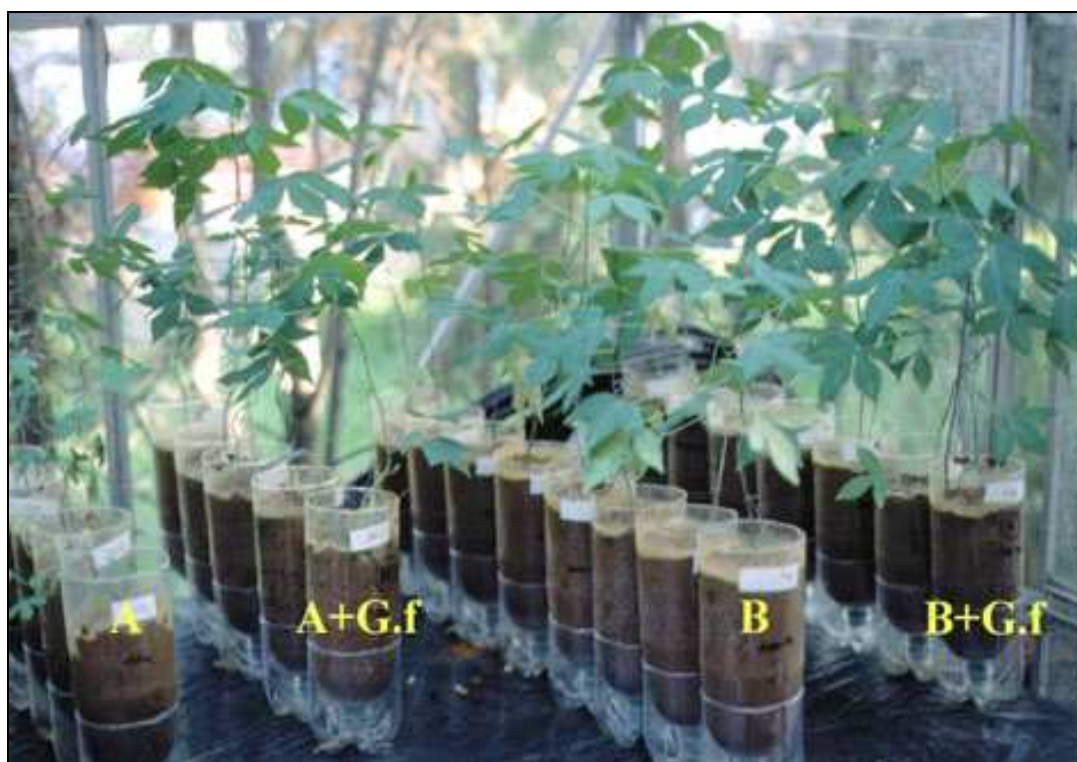
En consecuencia, existió una distribución de biomasa distinta entre las plantas A y B con una proporción de peso fresco parte aérea/peso fresco raíz de 1,59 en las A y de 2,41 en las B, y de 2,35 y 3,28 respectivamente para la misma correlación de peso seco. No obstante, no hubo diferencias significativas en la biomasa total de ambas plantas, aunque las B pesaron algo más. En consecuencia, no se pudo asegurar que las plantas previamente micorrizadas (B) tuviesen un mejor comportamiento in vitro ya que la

similitud en el desarrollo y la composición mineral de los grupos de plantas, pudo deberse a la gran influencia del medio nutritivo sobre las características del material cultivado.

Como se indicó en el apartado de materiales y métodos, las plantas A y B obtenidas in vitro se trasplantaron a condiciones externas sobre suelo estéril y sobre el mismo suelo con *Glomus fasciculatum*. Se establecieron en consecuencia cuatro grupos de plantas: A, A+G.f., B y B+G.f. En la figura 21 se presenta un aspecto de un grupo de plantas de cada uno de estos grupos tras 80 días de cultivo en invernadero. En la tabla 43 se indica, así mismo, el peso fresco, peso seco y grado de hidratación de las raíces, tallos, hojas y total de las plantas de cada grupo.

El peso fresco y seco de las raíces, tallos, hojas y en consecuencia del total de las plantas A (sin micorriza y de origen no micorrizado) fueron significativamente menores que los respectivos de las plantas A+G.f.. Es decir, que al igual que se había indicado ante en este capítulo y en el capítulo IV, la micorriza produjo un efecto altamente positivo en el desarrollo de la planta del clon SOM-1.

fig. 21. Plantas de los tipos “A” (no micorrizadas previamente) y “B” (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca, creciendo durante de 80 días en suelo sin micorrizar (A y B) y micorrizado con *Glomus fasciculatum* (A+G.f. y B + G.f.).



En las plantas del grupo B (sin micorriza y de origen micorrizado) se produjo una situación similar al comparar su peso fresco y seco con las del grupo B+G.f. Sólo que en estos casos en un nivel de biomasa superior. Es decir, el peso fresco y seco de las raíces, tallos y hojas de las plantas B fueron superiores a los de plantas A, y los de las plantas B+G.f. también superiores a las de A+G.f. En consecuencia, los explantos obtenidos de plantas micorrizadas del clon SOM-1, tras ser cultivados in vitro y formar nuevas plantas (con una parte aérea más desarrollada que las de origen no micorrizado) y ser trasplantadas a condiciones de invernadero, produjeron mayor cantidad de biomasa, que cuando las plantas trasplantadas procedían de explantos tomados de plantas no micorrizadas del mismo clon SOM-1.

Tabla 43. Peso fresco, peso seco y grado de hidratación de plantas del tipo “A” (no micorrizadas previamente) y “B” (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca, creciendo en invernadero durante 80 días en suelo no micorrizado (sin G.f.) y micorrizado con *Glomus fasciculatum* (con G.f.).

Clon	Organo	Tipo	Micorriza	Peso fresco		Peso seco		Hidratación	
				mg		mg		%	
SOM-1	Raíz	A	sin G.f.	69	c	25	c	61	a
			con G.f.	95	b	45	bc	53	ab
		B	sin G.f.	113	b	54	b	52	ab
			con G.f.	166	a	83	a	50	b
				**		**		*	
		Tallo	A	sin G.f.	638	c	96	b	85
	con G.f.			1133	ab	206	ab	83	ab
	B		sin G.f.	951	b	202	ab	80	b
			con G.f.	1688	a	317	a	82	ab
			**		**		*		
	Hojas		A	sin G.f.	833	c	131	c	81
		con G.f.		1964	ab	322	ab	83	a
		B	sin G.f.	1293	bc	221	bc	82	a
			con G.f.	2746	a	426	a	85	a
				**		**			
		Planta	A	sin G.f.	1540	c	252	c	83
	con G.f.			3192	ab	572	ab	82	a
	B		sin G.f.	2357	bc	477	bc	80	a
			con G.f.	4599	a	826	a	82	a
			**		**				

Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$) entre plantas de los tipos A y B sin inocular con *G. fasciculatum* según el test-T para muestras independientes. Letras diferentes en columna indican diferencias significativas ($P < 0,01$) según el test de Rango múltiple de Duncan.

Existió, por consiguiente un mayor desarrollo de la planta obtenida in vitro y trasplantada a condiciones externas cuando provenían de material micorrizado, que se demostró tanto cuando el trasplante se hizo a un sustrato inerte, y , más aún, cuando el sustrato estuvo micorrizado por *Glomus fasciculatum*.

Este hecho positivo y del que no tenemos constancia de haber sido indicado previamente en la bibliografía, pudo estar relacionado con características del material inicial micorrizado con *Glomus deserticola* (II Ag 8903).

Tabla 44. Estado nutritivo de raíz, tallo, hoja y planta de los tipos “A” (no micorrizadas previamente) y “B” (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca, creciendo en invernadero durante 80 días, no micorrizadas (sin G.f.) y micorrizadas con *Glomus fasciculatum* (con G.f.)

Clon	Organo	Tipo	Micorriza	%													
				N		P		K		Ca		Mg		Na		Cl	
SOM-1	Raíz	A	sin G.f.	0,623	b	0,193	a	0,437	a	1,968	a	0,352	a	0,317	a	0,497	a
			con G.f.	3,330	a	0,140	a	0,322	a	2,184	a	0,439	a	0,275	ab	0,080	b
		B	sin G.f.	1,118	b	0,137	a	0,327	a	2,425	a	0,424	a	0,236	ab	0,153	b
			con G.f.	1,365	b	0,177	a	0,359	a	2,220	a	0,406	a	0,159	b	0,263	ab
					**	*			*			*			**		
	Tallo	A	sin G.f.	1,965	a	0,091	a	2,028	a	1,485	a	0,157	a	0,148	a	0,505	a
			con G.f.	1,635	a	0,083	a	1,977	a	1,565	a	0,198	a	0,191	a	0,583	a
		B	sin G.f.	1,783	a	0,065	a	1,940	a	1,402	a	0,155	a	0,273	a	0,583	a
			con G.f.	1,213	a	0,071	a	1,575	a	1,223	a	0,147	a	0,139	a	0,450	a
	Hojas	A	sin G.f.	3,898	b	0,163	ab	1,987	a	2,285	ab	0,413	a	0,262	a	0,318	a
			con G.f.	3,607	b	0,208	a	2,260	a	3,082	a	0,426	a	0,239	a	0,227	a
		B	sin G.f.	4,658	a	0,121	b	1,863	a	2,110	c	0,390	a	0,237	a	0,248	a
			con G.f.	3,347	b	0,203	a	2,070	a	2,588	b	0,387	a	0,226	a	0,168	a
					*												
	Planta	A	sin G.f.	2,162	a	0,149	a	1,484	a	1,913	a	0,307	a	0,242	a	0,440	a
			con G.f.	2,829	a	0,144	a	1,590	a	2,282	a	0,349	a	0,232	a	0,309	a
		B	sin G.f.	2,520	a	0,108	a	1,377	a	1,979	a	0,323	a	0,249	a	0,328	a
			con G.f.	1,975	a	0,150	a	1,335	a	2,010	a	0,313	a	0,175	a	0,294	a
					*												

Clon	Organo	Tipo	Micorriza	ppm							
				Cu		Fe		Mn		Zn	
SOM-1	Raíz	A	sin G.f.	36	a	3870	a	364	b	158	a
			con G.f.	62	a	2195	b	404	b	71	b
		B	sin G.f.	33	a	4577	a	598	a	116	ab
			con G.f.	41	a	1440	b	257	b	54	b
		*									
	Tallo	A	sin G.f.	17	ab	118	a	77	a	87	a
			con G.f.	22	a	115	a	60	ab	36	a
		B	sin G.f.	14	ab	153	a	78	a	60	a
			con G.f.	8	b	87	a	42	b	22	a
		*									
	Hojas	A	sin G.f.	18	a	282	a	160	a	90	a
			con G.f.	28	a	260	a	130	a	60	a
		B	sin G.f.	16	a	278	a	129	a	68	a
			con G.f.	29	a	290	a	112	a	61	a
		*									
	Planta	A	sin G.f.	24	a	1423	a	200	a	112	a
			con G.f.	36	a	778	a	186	a	54	b
		B	sin G.f.	21	a	1669	a	268	a	81	ab
con G.f.			26	a	606	a	137	a	45	b	
*											

Los asteriscos indican diferencias significativas (* $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$) entre plantas de los tipos A y B sin inocular con *G. fasciculatum* según el test-T para muestras independientes. Letras diferentes en columna indican diferencias significativas ($P < 0,01$) según el test de Rango múltiple de Duncan.

Anteriormente se indicó (tabla 42) que ambos grupos de plantas (A y B) tras 65 días de cultivo in vitro no fueron muy diferentes en sus respectivos estados nutritivos. Algo parecido ocurrió tras el trasplante y ser cultivadas durante días en condiciones de invernadero. En efecto, como se observa en la tabla 44, en general, fueron escasas las diferencias estadísticamente significativas observadas en los contenidos de nutrientes respectivos con respecto al origen o al tratamiento fúngico de las plantas. Las variaciones puntuales existentes no pudieron ser relacionadas con ninguno de los dos factores anteriores y pudieron deberse a circunstancias no conocidas de la propia planta o del experimento. En consecuencia, el mayor peso de las plantas del grupo B sobre A y las respectivas micorrizadas B+G.f sobre A+G.f. no pudo relacionarse con diferencias relacionadas con un mejor estado en la nutrición mineral de las plantas.

En la figura 22 se muestran las raíces correspondientes de las plantas SOM-1 de los grupos A, A+G.f., B y B+G.f. teñidas con azul trypan. En las raíces de las plantas A no se observan estructuras de tipo fúngico teñidas como cabría esperar al haber sido trasplantadas a un sustrato previamente desinfectado. Por el contrario, en las raíces de las plantas A+G.f. se aprecian claramente estructuras fúngicas teñidas, que se corresponden con esporas de *Glomus fasciculatum* emitiendo hifas que progresan por el interior del cortex de la raíz. Esta situación es acorde con la presencia en el sustrato de trasplante de dichos hongos MVA, como ya se había observado en el capítulo VII.

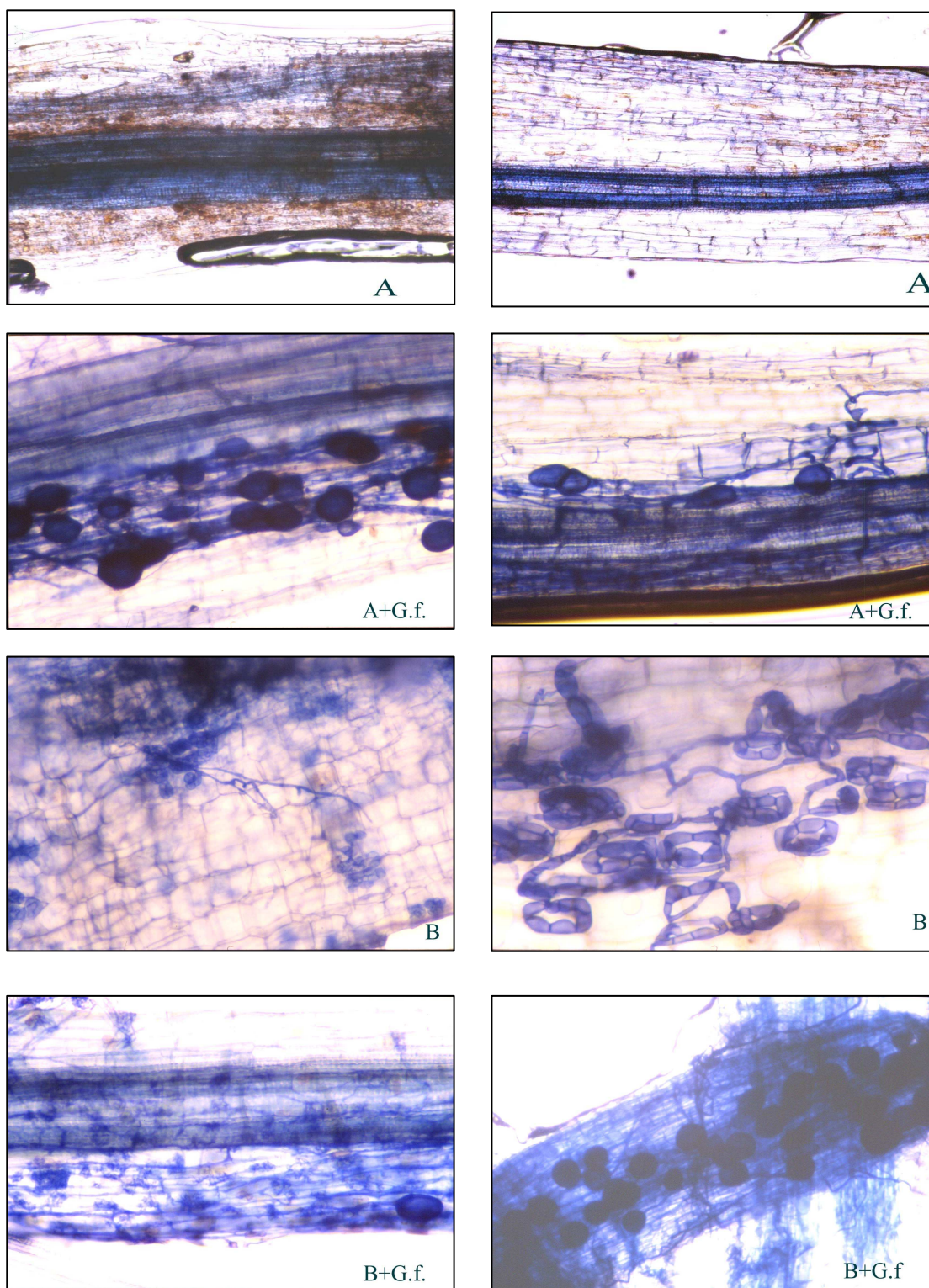
En las plantas B, en las que se esperaba una situación idéntica a la de A, se observaron estructuras de tipo fúngico teñidas por el azul trypan, que diferían de las observadas en las plantas del grupo A+G.f. Por último, en las plantas B+G.f. se observan esporas e hifas como en plantas A+G.f. y otras estructuras similares a las de las plantas B.

Las estructuras fúngicas que aparecen en las plantas B y B+G.f. y que no se corresponden con *Glomus fasciculatum* y que no se observan en plantas A, deben estar relacionadas con las plantas madres originales y haberse transmitido via explanto, ya que no pudieron originarse ni durante el proceso aséptico de cultivo in vitro, ni en el trasplante a suelo esterilizado micorrizando o no con *Glomus fasciculatum*, como lo prueban las plantas del grupo A y A+G.f. en las que no aparecen dichas estructuras.

En consecuencia, los factores que diferencian las plantas A y B y que pueden estar relacionados con la mayor producción de biomasa de las segundas son:

- Mayor desarrollo de las plantas madres B micorrizadas con *Glomus deserticola* (II Ag 8903) frente a las A no micorrizadas. Es decir un material

Fig. 22. Imágenes obtenidas en el microscopio de raíces de plantas A (no micorrizada y de origen no micorrizado), A+G.f. (micorrizada y de origen no micorrizado) donde se observan estructuras fúngicas características, B (no micorrizada y de origen micorrizado) donde se aprecian estructuras fúngicas y B+G.f. (micorrizada y de origen micorrizado) teñidas con azul trypan (100x) en donde, junto a las esporas propias de esta micorriza, se observa una mayor cantidad de hifas.



de partida diferente, que no obstante, no tiene un claro reflejo en la propagación in vitro salvo por un mayor desarrollo de la parte aérea.

Presencia en las raíces de las plantas B y B+ G.f. de estructuras fúngicas transmitida desde las plantas madres micorrizadas.

Para comprobar estos resultados, como se indicó en el apartado de Material y Métodos, se realizó un segundo experimento con plantas del grupo A y B del clon SOM-1 obtenidas in vitro, y en este caso trasplantadas a un sustrato estéril de arena lavada.

Como se observa en las figuras 23 y 24 las plantas del grupo B alcanzaron un mayor tamaño y número de hojas que las del grupo A, lo que concuerda con lo indicado en el experimento anterior. Además, cuando estas plantas se sometieron a riegos deficitarios, las del grupo A mostraron más clara y rápidamente signos de estrés hídrico. Así, apareció flacidez en el tallo por lo que en las fotos las plantas del grupo A aparecen apoyadas en el fondo, mientras que las del grupo B permanecieron erguidas. Se observó clorosis severas en las hojas terminales de las plantas A y un menor o nulo desarrollo de éstas.

Las raíces de las plantas A teñidas con azul trypan, al igual que se indicó en la prueba anterior no mostraron estructuras fúngicas (fig. 25a) mientras que las B presentaron de nuevo estructuras coloreadas como hifas, esporas y estructuras globosas asociadas (fig. 25 b, c, d, e y f).

También se observaron diferencias en la estructura anatómica de la raíz, tallo y hojas de las plantas A y B, tanto in vitro (fig. 26) como ex vitro (fig. 27).

La raíz de plantas del grupo A in vitro (fig. 26 a) presenta una epidermis, exodermis, parenquima cortical laxo y con grandes espacios intercelulares y un cilindro vascular tetrámero donde se alterna xilema y floema. En esta imagen no se aprecia endodermis ni periciclo como ocurre en la sección transversal de la raíz de la planta del grupo B (fig. 26 d) donde aparece claramente una endodermis con engrosamiento de la pared (bandas de Caspary) y un periciclo monoestratificado indicando un mayor desarrollo de esta raíz.

En el tallo del grupo A (fig. 26 b) se aprecian la epidermis, parénquima cortical seguido por el anillo vascular constituido por haces de floema, cambium vascular y xilema, a continuación se presenta el parénquima medular. En plantas del grupo B (fig. 26 e), tras la epidermis se aprecia una capa de colénquima que le confiere mayor rigidez, y en el parénquima cortical se observan unas estructuras inmersas en él.

fig. 23. Plantas de los tipos “A” (no micorrizadas previamente) y “B” (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca creciendo en cámara de cultivo durante 56 días.

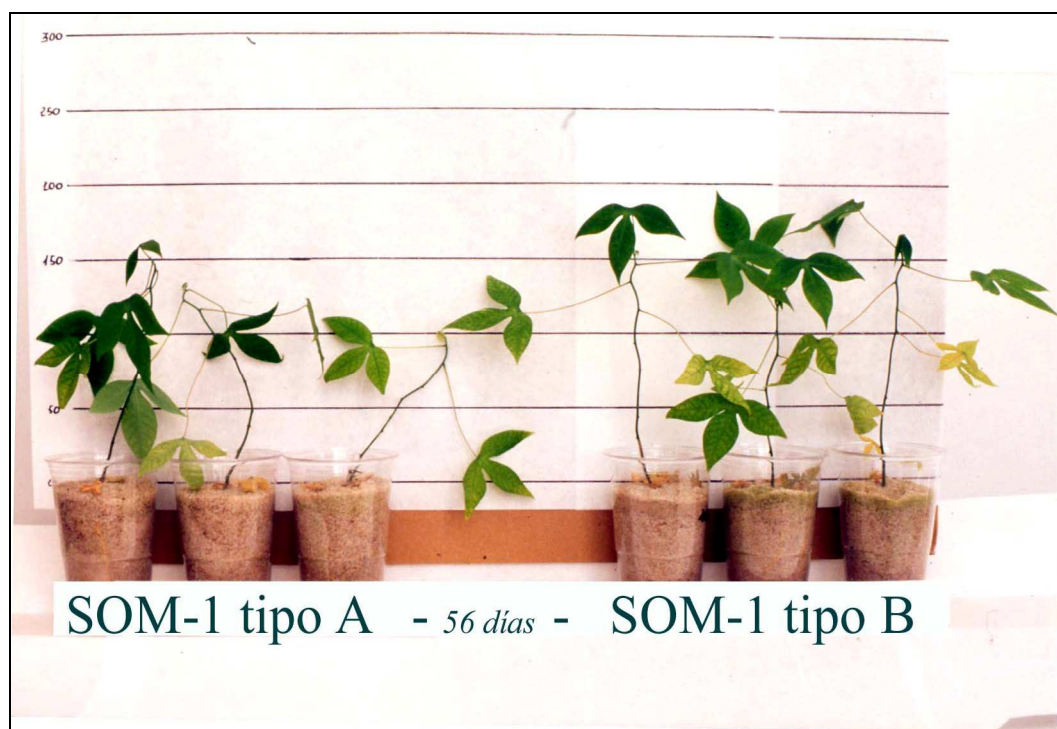


fig. 24. Plantas de los tipos “A” (no micorrizadas previamente) y “B” (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) del clon SOM-1 de mandioca creciendo en cámara de cultivo durante 70 días.

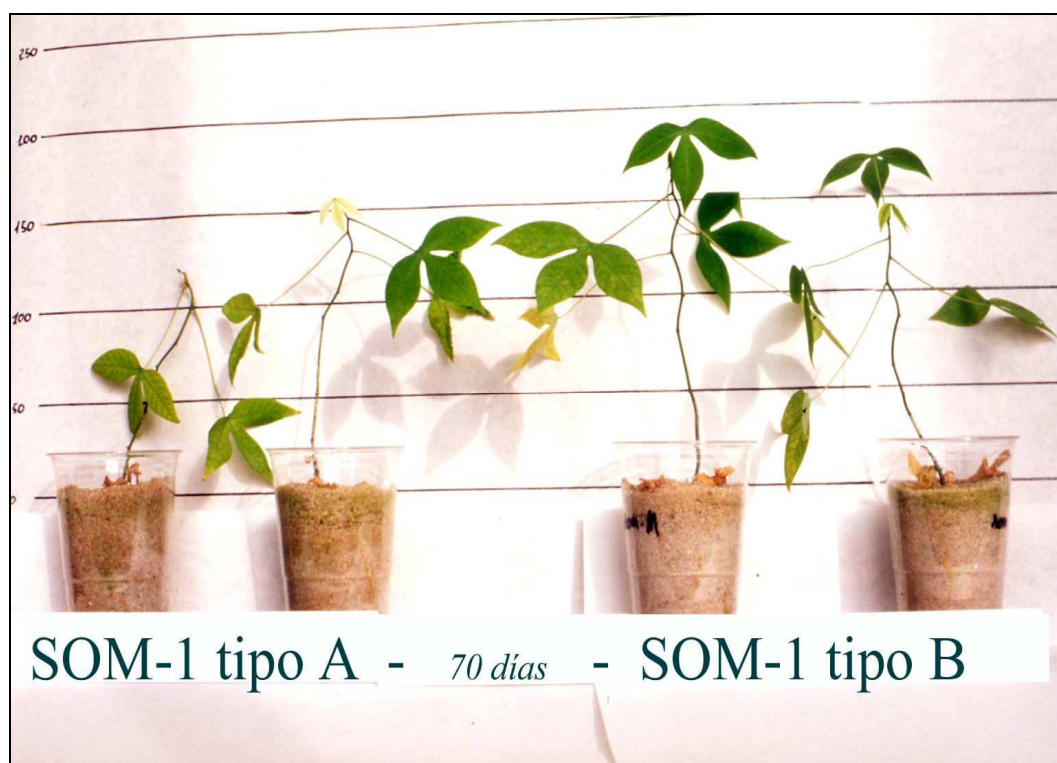
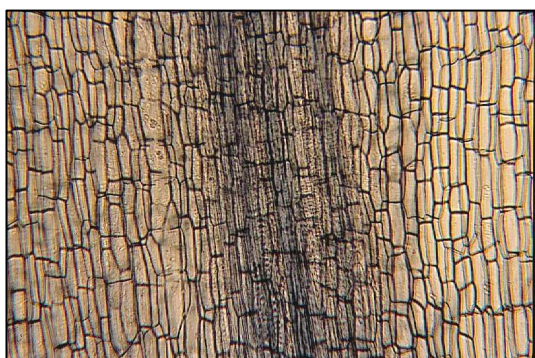
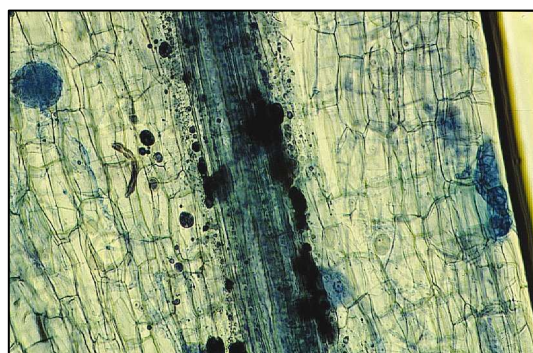


fig.25. Imágenes obtenidas en el microscopio de raíces de plantas A (no micorrizadas previamente) (a) donde no se observaron estructuras teñidas con azul trypan (40x) y B (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) (b) 40x, (c) 100x, (d) 100x, (e) 100x y (f) 400x, teñidas con azul trypan (100x) donde se pueden apreciar hifas y estructuras globosas que presentan afinidad por este colorante.



a.



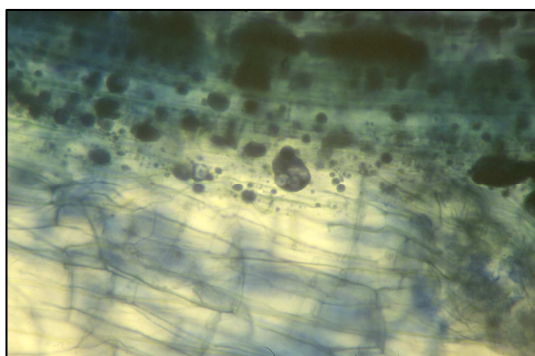
b.



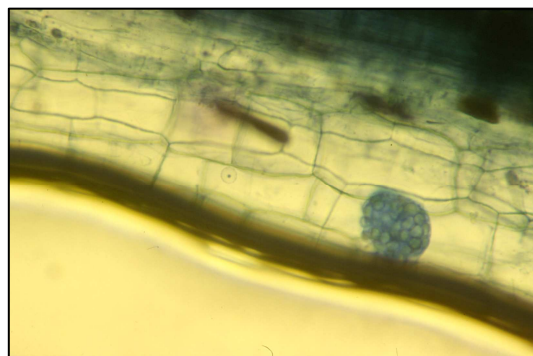
c.



d.



e.



f.

Por lo tanto también el tallo de las plantas del grupo B presentan un grado de desarrollo mayor que las plantas A.

Con respecto a las hojas, la principal diferencia entre ambos tipo de plantas radica en la organización de la misma apreciándose en las hojas de plantas B (fig. 26 f) un parénquima en empalizada y otro esponjoso junto con amplios espacios celulares, mientras que en plantas A (fig. 26 c) se aprecia en organización del mesófilo la presencia de amplios espacios intercelulares propios de plantas cultivadas in vitro.

fig. 26. Secciones transversales de raíz, tallo y hoja de planta de tipo A (no micorrizadas previamente (a, b y c respectivamente) y de tipo B (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) (d, e y f respectivamente), procedentes de cultivo in vitro y teñidas con fucsina- verde luz (200x). En la imagen d se aprecian hoquedades inmersas en el parénquima que no se apreian en la imagen a. Con respecto al tallo, en la imagen e se observan también unas estructuras próximas a la exodermis que no aparecen en la imagen b. Por último, en la imagen f se puede obserar una organización la hoja ligéramente distinta a la observada en la imagen c.

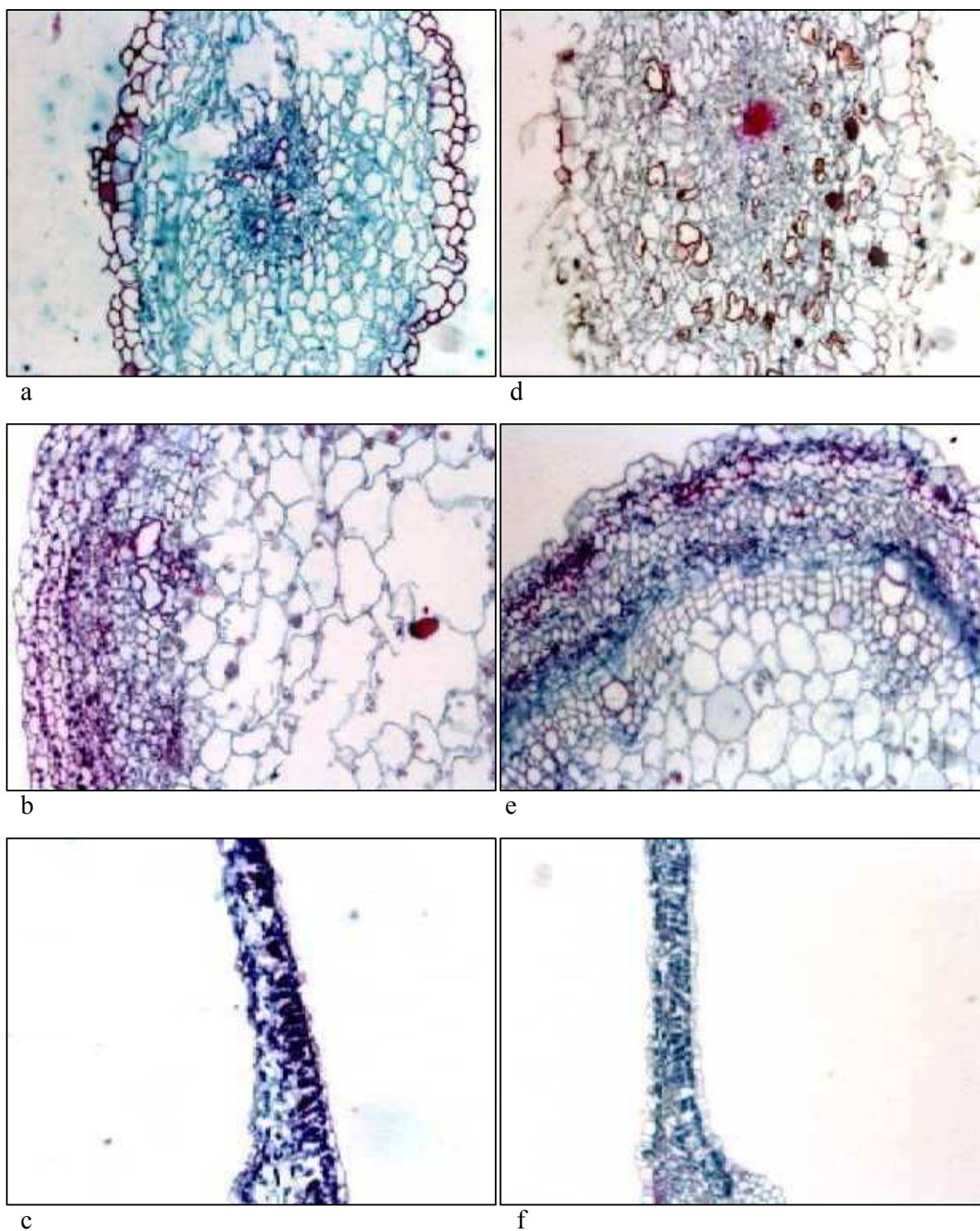
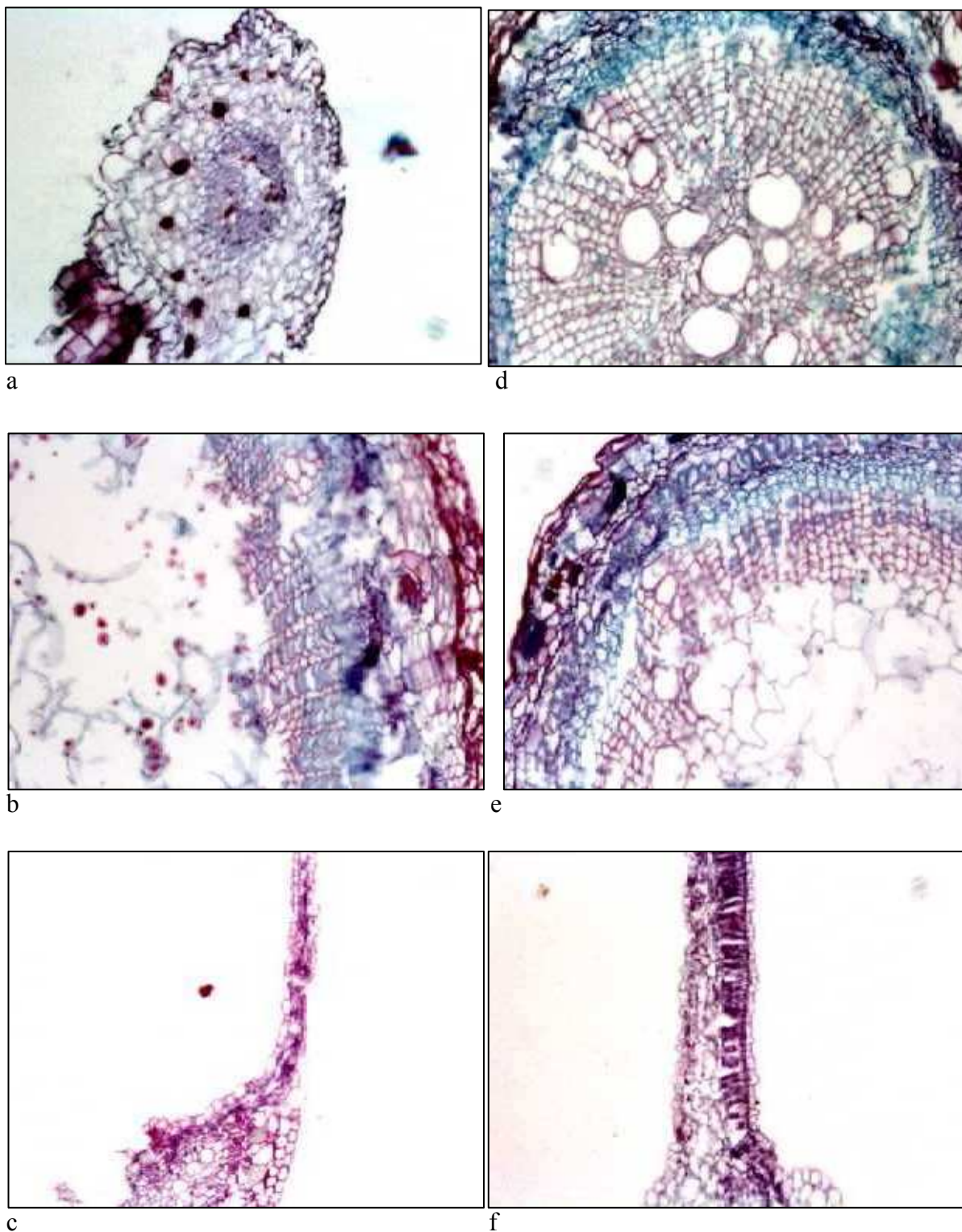


fig. 27. Secciones transversales de raíz, tallo y hoja de planta de tipo A (no micorrizadas previamente (a, b y c respectivamente) y de tipo B (micorrizadas previamente con *G. deserticola* (II Ag 8903)) (d, e y f respectivamente), procedentes de cultivo ex vitro y teñidas con fucsina- verde luz (200x). La imagen d corresponde a una de las con inicio de tuberización. Con respecto al tallo, en la imagen e se vuelven a observar unas estructuras próximas a la exodermis que no aparecen en la imagen b. Por último, en la imagen f se puede observar una mayor que organización la imagen c



Las secciones transversales de raíz, tallo y hoja de plantas de mandioca correspondientes a la figura 23, creciendo en arena de cuarzo ex vitro se observan en la figura 27. La raíz de las planta del grupo A (fig. 27 a) presenta un menor desarrollo que la del grupo B (fig. 25 d) la cual presenta un principio de tuberización y donde además se observa en el córtex una serie de huecos que no aparecen en A y que denota un mayor grado de desarrollo de estas plantas.

En el tallo de la planta del grupo B (fig. 27 e) también se puede observar una mayor estructuración de los diferentes tejidos así como la presencia de otras estructuras en el parénquima cortical que no se aprecian en el tallo de planta del grupo A (fig. 27 b). En las hojas se aprecia un mayor ordenación del mesófilo en plantas B (fig. 27 f) que en plantas A (Fig. 27 c).

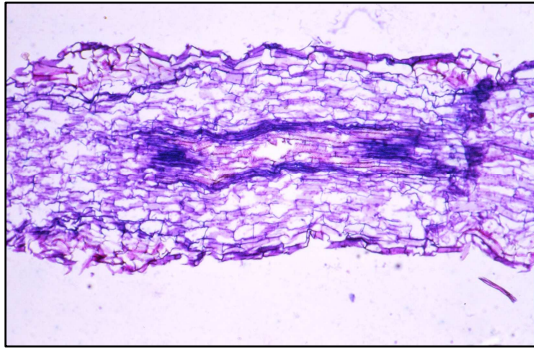
Las secciones longitudinales de raíces tanto in vitro como ex vitro (fig. 28) coloreadas con azul trypan denotan una mayor fijación de este colorante en las plantas del grupo B (fig. 28d y f) apreciándose en estas unas estructuras alargadas que invaden el parénquima cortical y que presentan al coloración azul, o rojiza en la tinción con fucsina-verde-luz. En las secciones de tallo tanto in vitro como ex vitro se aprecia una mayor concentración de azul trypan en el cortex de las plantas del grupo B (fig. 29d y f).

VIII. 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este capítulo ponen de manifiesto diferencias en el ámbito fisiológico y anatómico entre las plantas de SOM-1 que habían sido previamente micorrizadas con *Glomus deserticola* (II Ag 8903) (B) y las que no lo habían sido (A), tanto al ser cultivadas in vitro como, en especial, en condiciones externas.

En condiciones de cultivo in vitro, las principales diferencias encontradas estuvieron relacionadas con la distribución de fitomasa, con una mayor relación parte aérea-raíz en las plantas B. Es decir, presentaron una característica propia de las plantas micorrizadas (Smith, 1980). Por el contrario, no existieron diferencias entre el estado nutritivo de los dos grupos de plantas, lo que se relaciona con que ambos se cultivaron en medio de Murashige y Skoog (1962), dotado de nutrientes suficientes para cubrir las necesidades de las plantas.

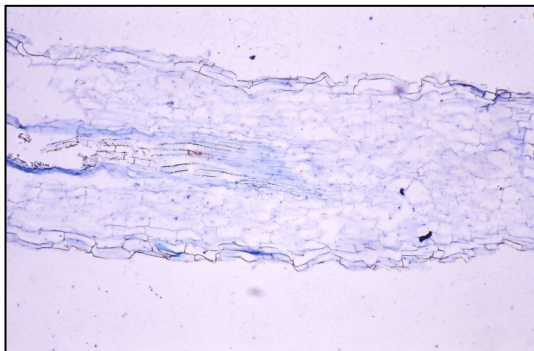
Fig. 28. Secciones longitudinales de raíces in vitro (a, b, c y d) y ex vitro (e, f, g y h) de plantas A y B empleando tinción Fucsina-verde luz y azul trypan (100x).



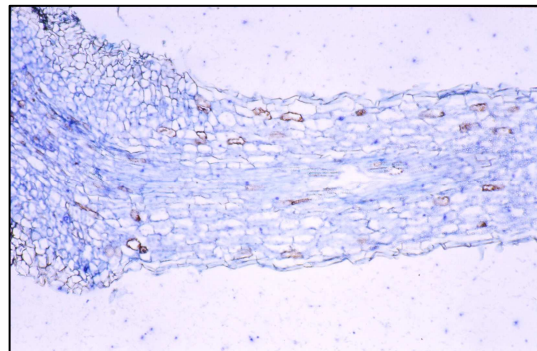
a.A



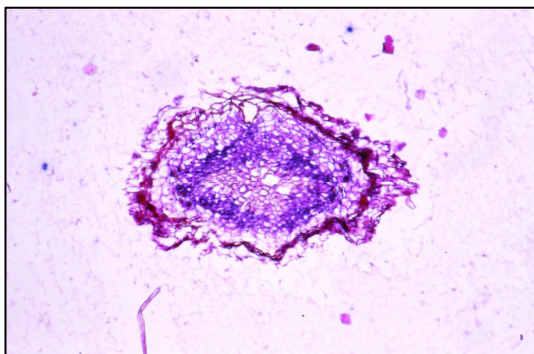
b.B



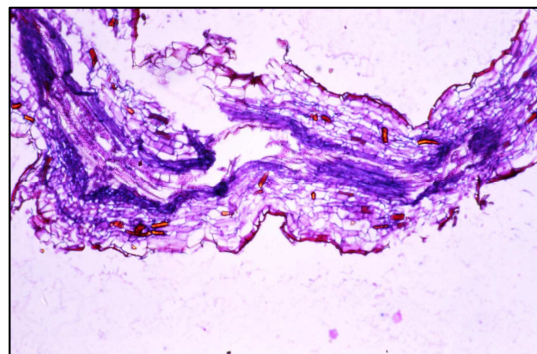
c.A



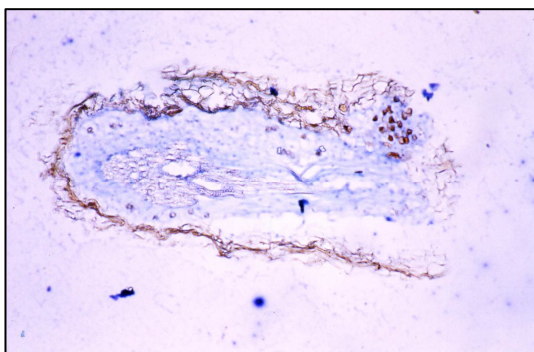
d.B



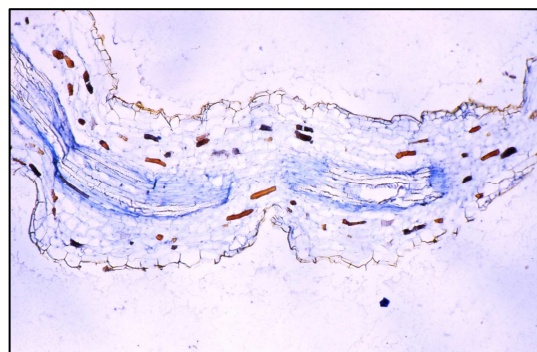
e.A



f.B

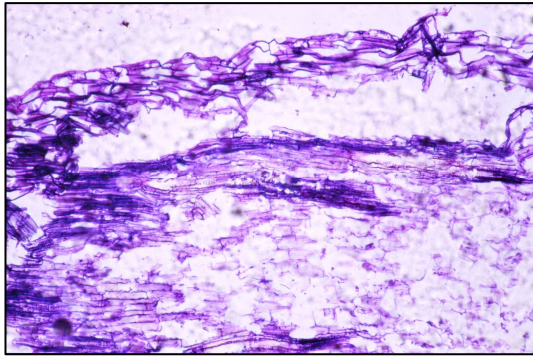


g.A

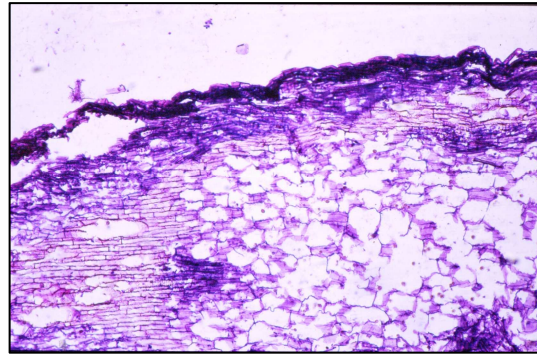


h.B

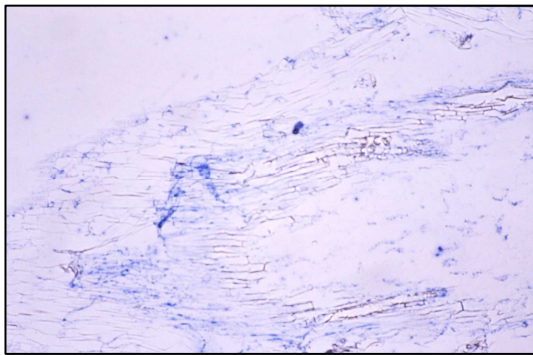
Fig. 29. Secciones longitudinales de tallos in vitro (a, b, c y d) y ex vitro (e, f, g y h) de plantas A y B empleando tinción Fucsina-verde luz y azul trypan (100x).



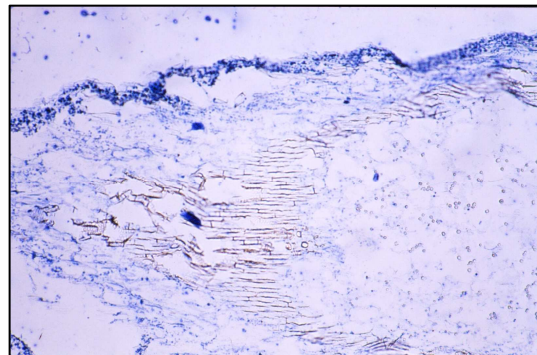
a.A



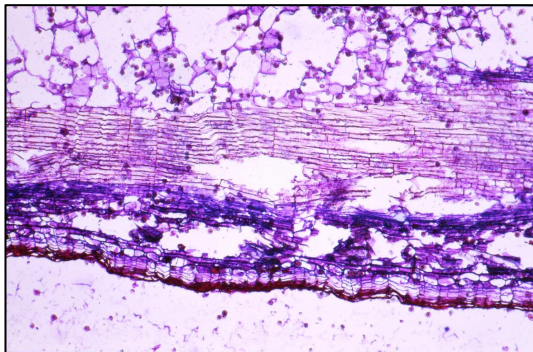
b. B



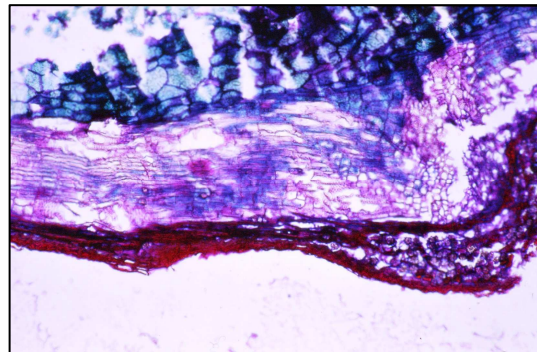
c.A



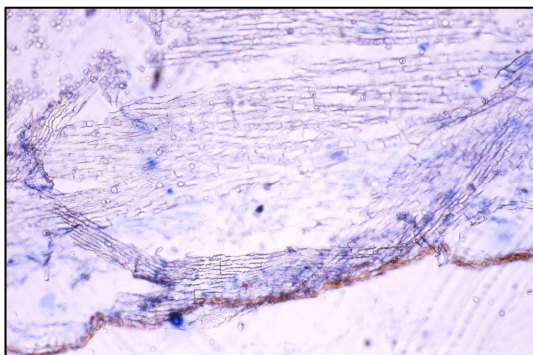
d.B



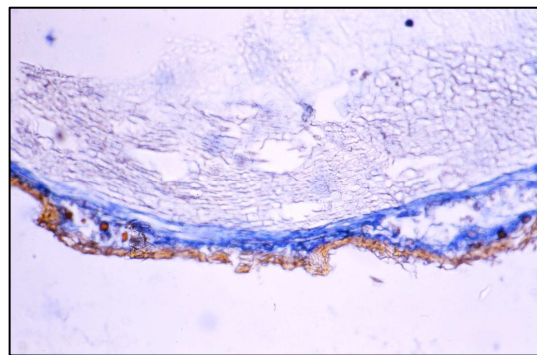
e.A



f.B



g.A



h.B

En el ámbito anatómico, las principales diferencias entre las plantas A y B in vitro consistieron en un mayor grado de diferenciación y desarrollo de los tejidos, así como en la presencia de estructuras quitinosas de origen fúngico en raíces y tallo de las plantas B al ser teñidas con azul trypan, probablemente relacionado con las características de las plantas de origen micorrizado. Esto último tuvo que ser debido a la presencia de material fúngico en el material vegetal de origen, empleado en repicado y que sirvió como vehículo de transmisión desde el material original de las plantas de tipo B, cosa que no ocurrió en las plantas de tipo A.

Una vez las plantas fueron transferidas a condiciones externas, esas diferencias se hicieron más patentes, en especial si el nuevo substrato contenía hongos micorrizantes como *G. fasciculatum*. Así, se encontraron grandes diferencias de desarrollo y producción de biomasa, entre los dos grupos de plantas (A y B, y A+G.f. y B+G.f.), un mayor grado de diferenciación de los tejidos y la presencia de estructuras fúngicas más evidentes en las plantas de tipo B con respecto a las plantas de tipo A. Estas diferencias pudieron ser debidas a distintas causas. En el caso de las plantas A frente a las B a las mejores condiciones iniciales del material micorrizado o a la presencia de hongos. En el caso de A+G.f. frente a B+G.f. a las dos circunstancias anteriores y a la acción del hongo *G. fasciculatum*.

La transmisión del hongo que aparece en las plantas B sólo se pudo hacer a través de los explantos utilizados en el cultivo in vitro y aunque aún no se han podido identificar tienen que ser acompañantes de la cepa de *Glomus deserticola* (II Ag 8903) (Azcón, comunicación personal) o bien el propio MVA. En cualquier caso la obtención de plantas de mejor calidad por cultivo in vitro de yemas procedentes de material micorrizado con este hongo y que se describe por primera vez en la bibliografía, es un hecho de importancia que mejora notablemente la calidad de las plantas de mandioca propagadas in vitro.

IX. DISCUSIÓN GENERAL

La demanda creciente de mandioca para su uso en alimentación humana y animal y como consecuencia, la extensión de su cultivo, implica el desarrollo de estrategias de selección del material vegetal que permitan su adaptación a las nuevas zonas, conservando o si es posible aumentando los rendimientos. La salinidad de los suelos en muchas zonas donde la mandioca podría cultivarse, representa un problema de gran importancia, por lo que la disponibilidad de clones tolerantes es muy necesaria.

Una metodología para abordar el problema requiere la recolección de material vegetal, preferiblemente adaptado a ambientes salinos, su propagación y conservación en condiciones que permitan garantizar su estabilidad genética y un perfecto estado sanitario, junto con su selección y caracterización para su empleo racional en medios salinizados. Estas exigencias, apuntan al cultivo *in vitro* como método muy apropiado para la consecución de los objetivos (Nzoghe, 1989).

En el presente trabajo se ha conseguido la propagación *in vitro* de los tres clones de mandioca en consideración (SOM-1, 05 y 50) en una sola fase, en medio MS sin reguladores de crecimiento ni vitaminas. Este hecho contrasta con la metodología seguida en la mayoría de las plantas que se propagan *in vitro* (Murashige, 1974; Debergh y Maeve, 1981) incluida la mandioca (Nair et al., 1979; Roca, 1986; Stamp y Henshaw, 1986; Ma, 1998) en los que la regeneración se hace en dos fases (crecimiento de la parte aérea y enraizamiento) y necesitan citoquininas en la primera y auxinas en la segunda como reguladores de crecimiento (Litz y Gray, 1992).

Pierik (1986), indicó que cuando en el cultivo *in vitro* se producen diferentes subcultivos, el material vegetal que inicialmente necesita reguladores de crecimiento para su desarrollo, a medida que se vuelve a cultivar se va haciendo menos exigente, hasta no necesitar de dichas sustancias. Es decir, se produce un proceso de habituación del material. Horgan (1986) propuso una teoría según la cual la habituación podría ser hereditaria en algunos casos. No obstante, Pierik (1990) asoció dicha habituación con el proceso de rejuvenecimiento que sufren los tejidos vegetales cuando son cultivados *in vitro*. También se debe considerar la posibilidad de que tras diversos subcultivos en medios con reguladores de crecimiento, el material vegetal mejore el equilibrio endógeno de estas sustancias y haga menos necesarios los aportes externos.

En cualquier caso, los explantos uninodales de los tres clones de mandioca considerados, fue un material bien diferenciado que se multiplicó perfectamente en un solo cultivo y en ausencia de reguladores de crecimiento en el medio nutritivo. Esto proporcionó material suficiente para las distintas pruebas a realizar, con una alta garantía de estabilidad genética al evitarse la variación somaclonal.

El cultivo in vitro de células vegetales en medio nutritivo salinizado con NaCl, ha sido utilizado con relativa frecuencia para la obtención de plantas tolerantes (Gangopadhyay et al., 1997; Basu et al., 1997). No obstante, este método presenta el problema de que muchas veces existe una falta de correspondencia entre los mecanismos de tolerancia a la sal de la célula y los de la planta completa (Tal, 1994). Por ello, en el presente trabajo se eligió un material vegetal como el explanto nodal, mucho más diferenciado y en consecuencia con mayores posibilidades de correlación entre la tolerancia in vitro y en condiciones externas.

El cultivo in vitro en medio salino de segmentos nodales de los tres clones en consideración, indicó que este tipo de material no soportó concentraciones superiores a $2,5 \text{ g l}^{-1}$ de NaCl en el medio. Es decir, salinidades inferiores a las toleradas por otros explantos in vitro como la vid (Troncoso et al., 1999 a), u olivo (Troncoso et al., 1999 b), cuando en condiciones de campo, la mandioca puede ser considerada como tolerante.

En consecuencia, el material in vitro demostró una fuerte sensibilidad a la presencia de sal (NaCl) en el medio. No obstante, existió una gradación de comportamiento entre los tres clones usados de forma que se pudo establecer una clasificación de tolerancia relativa entre ellos ($\text{SOM-1} > 50 > 05$).

El comportamiento de los tres clones de mandioca cultivados en condiciones de invernadero y sometidos a concentraciones crecientes de NaCl disuelto en la solución nutritiva, determinó una clasificación por tolerancia igual a la indicada para el cultivo in vitro, es decir $\text{SOM} > 50$ y 05 . Existió en consecuencia una correlación entre la respuesta relativa de cada clon in vitro y ex vitro, aunque a distintos niveles de salinidad. Como se ha indicado, el material in vitro presentó problemas ante concentraciones de NaCl superiores a 2 g l^{-1} , mientras que en las condiciones de invernadero en general las plantas soportaron bien concentraciones de NaCl de 4 g l^{-1} , y el clon SOM-1 hasta 8 g l^{-1} .

Junto a provocar la muerte de algunas plantas y el descenso en el desarrollo y producción de biomasa en las plantas supervivientes, el efecto de la sal (NaCl) se

caracterizó por originar disminuciones importantes del grado de hidratación de los tejidos de la hoja, en especial en los clones menos tolerantes, y acumulación de Na^+ y Cl^- . Es decir, se produjeron los efectos (osmótico y tóxico) indicados en la bibliografía como características de la acción salina (Munns, 1993). La correlación entre los niveles de Na^+ y Cl^- en el medio y en la planta, permiten pensar que los contenidos de estos iones en los tejidos del vegetal son buenos indicadores para conocer la salinidad que en un momento dado soporta la mandioca.

Indira y Ramanujam (1982), trabajando con plantas jóvenes de 15 cultivares de mandioca en condiciones de invernadero también observaron que concentraciones de 1500 ppm ($1,5 \text{ gl}^{-1}$) de NaCl no afectaron el crecimiento de dichas plantas. Por el contrario, Hawker y Smith, (1982), aplicando soluciones de 50 mM (3 gl^{-1}) de NaCl observaron reducciones del 50% en el peso fresco de los tubérculos de las plantas de mandioca. De estos resultados se deduce que en especial, el comportamiento del clon SOM-1 ante la sal definido en este trabajo, denota un grado interesante de tolerancia como corresponde a una variedad cultivada desde hace muchos años en una zona árido-salina del desierto de Somalia.

La correlación entre el comportamiento in vitro y ex vitro de los clones de mandioca en consideración, puesta de manifiesto en este trabajo por primera vez, representa en principio un hallazgo de gran interés, ya que tras nuevas comprobaciones, el cultivo in vitro puede representar una ventaja importante de tiempo, espacio y economía en los estudios de salinidad con la mandioca.

La presencia de micorriza *Glomus deserticola* (II Ag 8903) o *Glomus fasciculatum* incrementó muy significativamente el desarrollo de los tres clones de mandioca al ser trasplantados desde in vitro a condiciones de invernadero, lo que demostró el carácter de micorriza-dependiente que se atribuye a la mandioca (Janos, 1980; Habte y Byappanahalli, 1994). Existen otros precedentes en los que la micorriza afectó positivamente a la planta de mandioca (Carretero et al., 1997 Fagbola, 1998). Junto a ser más desarrolladas y posiblemente influenciadas por ello, las plantas de mandioca micorrizadas toleraron mejor la sal que las no micorrizadas, lo que es de gran interés para la posible adaptación de esta especie a nuevas zonas de cultivo con carácter salino. En este sentido, se debe destacar que con el binomio clon SOM-1-micorriza se logró una tolerancia muy elevada, y lo hace especialmente interesante.

Trabajos en los que se relaciona la tolerancia a la sal con la micorriza fueron realizados por Azcón y El-Atrash (1996) en alfafa, Carretero et al., (1997) en mandioca o Copeman et al., (1996) y Al-Karaki y Hammad, (2001) en tomate.

Las causas de esta mejor tolerancia parecen estar relacionadas con un mayor crecimiento y adquisición de nutrientes (Al-Karaki, 2000) y a unas mejores relaciones hídricas (Gu, 1998) en plantas micorrizadas frente a no micorrizadas en ambientes salinos.

Otro aspecto muy interesante de la simbiosis hongo micorrícico-mandioca, considerado por primera vez en este trabajo, fue el comportamiento in vitro in vitro y ex vitro de material de mandioca previamente micorrizado. En efecto, como se indicó antes, los segmentos nodales procedentes de tallos de plantas micorrizadas, produjeron in vitro plantas con una biomasa similar a la de aquellos procedentes de mandioca no micorrizada, aunque con una relación parte aérea-raíz muy superior. No obstante, cuando se trasplantaron a condiciones de invernadero el desarrollo de las plantas de origen micorrizado fue muy superior. Junto con este mayor desarrollo, las plantas de origen micorrizado mostraron una serie de distinciones anatómicas tanto in vitro como ex vitro, basadas fundamentalmente en un mayor grado de diferenciación de tejidos, en la observación de estructuras no identificadas por nosotros en plantas de origen micorrizado y localizadas en el parénquima cortical de tallo y raíz, y la presencia de estructuras fúngicas en sus raíces. Dado el proceso totalmente aséptico seguido en el cultivo in vitro, la presencia de estos hongos sólo pudo ser debida a una transmisión por el explanto inicial. Aunque no se ha podido clasificar dichos hongos, sólo existen dos posibilidades; o se trata de hongos que acompañan al inóculo de *Glomus deserticola* (Ag 8903) capaces de alcanzar el sistema vascular de la planta para instalarse en la parte aérea de la misma, o bien se trata del propio *G. deserticola* cuyas hifas podrían progresar por el córtex hacia la parte aérea de la planta dadas las características histológicas que presentan las plantas procedentes de cultivo in vitro e el momento del trasplante. Por otra parte micorrización de plantas cultivadas in vitro en la fase de enraizamiento ya ha sido experimentada en varias especies (Pons et al., 1983; Chavez y Ferrera-Cerrato, 1990; Mathur y Vyas, 1995).

En cualquier caso, es importante de destacar que las plantas obtenidas in vitro a partir de explantos procedentes de tallos de plantas micorrizadas se desarrollaron más cuando se trasplantaron a condiciones externas que las equivalentes provenientes de plantas no micorrizadas y que ello pudo estar relacionado o con las mejores condiciones

de las plantas de origen, o con la presencia de hongos en las primeras, o con ambas a la vez.

X. CONCLUSIONES

1. Por el método utilizado en este trabajo, los tres clones de mandioca considerados, SOM-1, 05 y 50, respondieron muy bien a la propagación in vitro por medio de segmentos nodales, incluso sin adición de reguladores de crecimiento, formando plantas completas (desarrollo de la parte aérea y del sistema radical) en una sola fase de cultivo. Esto representa un ahorro de tiempo, trabajo y costes sobre el sistema tradicional de micropropagación de la mandioca, que se hace en dos fases; una para el desarrollo de la parte aérea y otra de enraizamiento.
2. Contenidos superiores a 2 gl^{-1} de NaCl en el medio de cultivo, afectaron negativamente la supervivencia y el desarrollo del material in vitro de los tres clones de mandioca, aunque se pudieron establecer diferencias entre ellos. El clon SOM-1 fue el que soportó mejor el estrés salino y el clon 05 fue el más sensible. Por el contrario, concentraciones más bajas de NaCl en el medio favorecieron el desarrollo de la planta de mandioca in vitro.
3. Junto a la incidencia sobre la supervivencia y el desarrollo del material de mandioca in vitro, la presencia de sal en el medio afectó negativamente el grado de hidratación de los tejidos de la hoja (más en los clones menos tolerantes) y originó una fuerte acumulación de sodio y cloro en la planta. Es decir, se produjeron los dos efectos indicados en la bibliografía como responsables de la acción negativa de la sal.
4. La presencia de sal (NaCl) en la solución nutritiva, dada a plantas de los tres clones de mandioca cultivados en contenedores en cámara de cultivo, también afectó su supervivencia, desarrollo, grado de hidratación foliar y acumulación de sodio y cloro, y con el mismo orden de tolerancia entre clones (SOM-1 > 50 > 05) que el indicado in vitro.
5. Con independencia del nivel de tolerancia en cada caso (in vitro y ex vitro), el comportamiento equivalente ante la sal de los tres clones de mandioca en ambas condiciones de cultivo avalan la posibilidad de uso de la técnica de cultivo in vitro para evaluar el comportamiento ante la sal (NaCl) del material de mandioca. Este

hecho, puesto de manifiesto por primera vez en la bibliografía de esta especie, se considera de gran interés en los estudios sobre salinidad y mandioca.

6. La micorriza mandioca-*Glomus* ssp. favoreció muy significativamente el desarrollo de las plantas de los tres clones de mandioca tras el trasplante in vitro-ex vitro, lo que demostró además el carácter micorrizo-dependiente de este género.
7. En concordancia con el mejor desarrollo de las plantas, la presencia de micorriza también aumentó claramente la tolerancia a la sal (NaCl) de los tres clones de mandioca.
8. Segmentos nodales procedentes del tallo de plantas micorrizadas y no micorrizadas, del clon SOM-1, formaron in vitro plantas semejantes aunque con una mayor relación parte aérea-raíz en las primeras. Una vez estas plantas fueron trasplantadas a condiciones externas, las de origen micorrizado tuvieron un mayor desarrollo que las de origen no micorrizado.
9. Junto al mayor desarrollo, las plantas de origen micorrizado mostraron en sus raíces la presencia de formaciones fúngicas y modificaciones anatómicas que difieren de lo observado en las plantas de origen no micorrizado. Las formaciones fúngicas, aún no identificadas se transmiten desde las plantas originales a través del tallo en el cultivo in vitro y se relacionan con el mayor desarrollo de las plantas obtenidas.
10. La combinación de tolerancia a la sal del clon SOM-1 de mandioca, como corresponde a una planta adaptada a las condiciones árido-salinas del desierto de Somalia, su cultivo in vitro en medio salino, y la acción positiva de la micorriza con *Glomus deserticola* (II Ag 8903), ha dado lugar a un material bastante tolerante al estrés salino, disponible para ser ensayado en campo en aquellos países donde la salinidad afecta claramente al cultivo de la mandioca.

XI. BIBLIOGRAFIA

- Abbott L.K. y Robson A.D. 1984.** The effect of mycorrhizas on plant growth. En *VA Mycorrhiza*. Powell, C.L., Bagyaraj, D.J. (eds), CRC Pres, Boca Raton, Florida, pp113-130.
- Adams P., Thomas J.C., Vernon D.M., Bohnert H.J. y Jensen R.G. 1992.** Distinct cellular and organismic responses to salt stress. *Plant Cell Physiol*, v. 33, 8: 1215-1223.
- Adapare G.O. y Coutts R.H.A. 1981.** Eradication of cassava mosaic disease from nigerian cassava clones by meristem-tip cultures. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 1:25-32.
- Ahloowalia B.S. 1978.** Novel ryegrass genotypes regenerated from embryo callus culture. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture* (Thorpe T.A. ed.) Abstr. 1733. P 161.Bess. Calgary.
- Alhagdow M.M., Barthakur N.N. y Donnelly D.J. 1999.** Salinity stress and sodium-potassium interactions in micropropagated potatoes. *Potato-res.* v. 42, 1:73-78.
- Al-Karaki G. N. 2000.** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza*. 10: 51-54.
- Al-Karaki G. N. y Hammad R. 2001.** Mycorrhizal influence on fruit yield and mineral content of tomato grown under salt stress. *Journal of plant Nutrition*. 24: 1311-1323.
- Allen E.B. y Cunningham G.L. 1983.** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizae on *Distichlis spicata* under three salinity levels. *New Phytol.* 93: 227-236.
- Allen, E.B. y Allen, M.F. 1986.** Water relations of xeric grasses in the field: interactions of mycorrhizas and competition. *New Phytol.* 104: 559-571.
- Allen, M.F., Moore T.S. y Christensen M. 1980.** Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. I. Cytokinin increases in the host plant. *Can. J. Bot.*, 58: 371-374.
- Angelov M.N., Sun J.D., Byrd G.T., Brown R.H. y Black, C.C. 1993.** Novel Characteristics of Cassava, *Manihot-Esculenta* Crantz, a Reputed C₃ – C₄ Intermediate Photosynthesis Species. *Photosynthesis Research*, Vol 38, Iss 1, pp 61-72.
- Ashraf M., McNeily T. y Bradshaw A.D. 1986.** The response of selected salt-tolerant and normal lines of four grass species to NaCl in sand culture. *The New Phytology*. 104: 453-461.
- Aslam M., Huffaker R.C. y Rain, D.W. 1984.** Early effects of salinity on nitrate assimilation in barley seedlings. *Plant Physiol.* 76: 321-335.
- Awad A.S., Edwards D.G. y Campbell L.C. 1990.** Phosphorus enhancement of salt tolerance of tomato. *Crop Sci.* 30: 123-128.

Azcón R., Barea J.M. y Hayman D.S. 1976. Utilization of rock phosphate in alkaline soils by plants inoculated with mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 8: 135-138.

Azcon, R.; El-Atrash, F. 1997. Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N₂ fixation (15N) in *Medicago sativa* at four salinity levels. *Biol. fertil. soils.* 24(1): 81-86.

Azcón-Aguilar C. y Barea J.M. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology top horticulture significance and potentials. *Sci. Horticult*, 68:1-24.

Azcón-Aguilar C., Troncoso A., Cantos M. y Barea, J.M. 1997. Beneficial effect of arbuscular mycorrhizas on acclimatization of micropropagated cassava plantlets. *Scientia Horticulturae*, V. 72, 1:63-71.

Babaeva, Zh.A. Butenko, R.G. y Strogonov. B.P. 1968. Influence on salinitation of the nutrient medium on the growth of isolated carrot tissue. *Soviet Plant Physiol.*, 15: 75-82.

Barea J.M. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhizae as modifiers of soil fertility. *Advances in Soil Science.* 15:1-39.

Barea J.M. y Azcón-Aguilar C. 1982. Production of plant growth regulating substances by vesicular arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Appl. Environ. Microbiol*, 43: 810-813.

Barea J.M. y Jeffries P. 1995. Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil plant system. In A. Varma and B Hock (editors), *Mycorrhiza Structure, Function, Molecular Biology and Biotechnilogy*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp 521-560.

Barlass M. y Skene K.G.M. 1981. Relative NaCl Tolerances of Grapevine Cultivars and Hybrids in vitro. *Z. Pflanzenphysiol.* 102: 147-161.

Bass, R. y Kuiper, D. 1989. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal infection and phosphate on *Plantago major* spp *pleiosperma* in relation to external cytokinin concentrations. *Physiol. Plantarum*, 76: 211-215.

Basu S., GangopadhyayG., Mukherjee B.B. y Gupta S. 1997. Plant regeneration of salt adapted callus of indica rice (var. Basnati 370) on saline conditions. *Plant cell, tissue organ cult.* Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers. 1997. v. 50 (3) p. 153-159.

Bernstein L., Francois L.E. y Clark R.A. 1974. Interactive effects of salinity and fertility on yields grains vegetables. *Agron. J*, 66: 412-421.

Bernstein L. 1963. Osmotic adjustment of plant to saline media. II. Dinamyc phase . *American Journal of Botany*, 50: 360-370.

Bernstein L. y Hayward H.E. 1958. Physiology of salt tolerance. *Annual Review of plant Physiology*, 9: 25-46.

Berta G., Fusconi A., Trotta A. y Scannerini S. 1990. Morphogenetic modifications induced by the mycorrhizal fungus *Glomus* strain E3 in the root system of *Allium porrum* L. *New Phytol.* 114, 207-215.

Bhagwat B., Vieira L.G.E. y Erickson L.R. 1996. Stimulation of in vitro shoot proliferation from nodal explants of cassava by thidiazuron, benzyladenine and gibberellic acid. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, v 46, 1: 1-7.

Bolan N.S., Robson A.D and Barrow N.J. 1987. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhiza on the availability of iron phosphates to plant. *Plant soil*, 22: 401-410.

Brownell P.F. 1965. Sodium as an essential micronutrient element for a higher plants (*Atriplex vesicaria*). *Plant Physiol*, 40: 460-468.

Brownell, P.F. 1979. Sodium as an essential micronutrient element for plants and its possible role in metabolism. *Adv. Bot. Res.* 7: 117-224.

Brundrett M.C. 2002. Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist*. 154: 275-304.

Butler J.H.A. 1987. The effect of defoliation on growth and N₂ fixation by *Medicago* sp. grown alone or with ryegrass. *Soil Biol. And Biochem*, 19: 373-279.

Cano E.A., Perez-Alfocea F., Moreno V., Caro M. y Bolarin M.C. 1998 Evaluation of salt tolerance in cultivated and wild tomato species through in vitro shoot apex culture. *Plant-cell,-tissue-organ-cult*, v. 53, 1: 19-26.

Cano V.M.A. 1991. Evaluación y caracterización in vitro e in vivo, de la tolerancia a la salinidad de *Lycopersicon* spp. *Tesis Doctoral*. Universidad de Murcia, pp.267.

Cantos M., Liñán J., Pérez-Camacho F. y Troncoso A. 1993. Obtención de plantas selectas de vid, variedad Zalema, libres de virosis de entrenudo corto. *Actas de Horticultura*, 1: 705-709.

Carretero C.L., Cantos M. y Troncoso A. 1997. Efecto de dos hongos endomicorrizantes vesículo-arbusculares en plantas de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) bajo condiciones salino sódicas. *Nutrición Mineral de Plantas Cultivadas en Agricultura Sostenible*. 49/97 Congresos y Jornadas. Junta de Andalucía. pp 211-217.

Carretero C.L., Cantos M. y Troncoso A. 1999. Efecto de la micorriza vesículo arbuscular en la aclimatación de patrones de vid micropropagados. *Viticultura y Enología Profesional*, 60: 28-36.

Chalupa V. 1988. Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Bio Plant*, 30: 414-421.

Champagnol F. 1979. Relationships between phosphate nutrition of plants and salt toxicity Phosphorus. *Agri.* 76: 35-43.

Chávez Mc. G. y Ferrera-Cerrat R. 1990. Effect of vesicular arbuscular mycorrhizae on tissue culture derived plantlets of strawberry. *HortScience*, 25: 903-905.

Chen C.C., Dixon J.B. y Turner, F.T. 1980. Iron coatings on rice roots: mineralogy and quantity influencing factors. *Soil Sci. Am. J.* 44: 635-639.

Choi J.H., Lui Liang-Shi, Borkird C. y Sung Z.R. 1987. Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84: 1906-1910.

Choudhury B.J. y Monteith J.L. 1986. Implications of stomatal response to saturation deficit for the heat balance of vegetation. *Agricultural and Forest Metodology*, v. 36, 3: 215-225.

Clark R.B. y Zeto, S.K. 2000. Mineral Acquisition by Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Journal of Plant Nutrition*, v 23, 7: 867-902.

Cock J.H. 1982. Cassava: a basic energy source in the tropics. *Science*, 218: 755-762.

Copeman R.H., Martin C.A. y Stutz J.C. 1996. Tomato growth in response to salinity and mycorrhizal fungi from saline or nonsaline soils. *HortScience*. Alexandria, Va. : The American Society for Horticultural Science. June 1996. v. 31 (3) p. 341-344.

Crafts C.B. y Miller O. 1974. Detection and identification of cytokinins produced by mycorrhizal fungi. *Plant Physiol.* 54: 586-588.

Cram W. J. 1973. Internal factors regulating nitrate and chloride influx in plant cells. *J. Exp. Bot.*, 24: 328-341.

Cram W.J. 1983. Chloride accumulation as a homeostatic system: Set points and perturbations. *Journal of Experimental Botany*, 34: 1484-1502.

Cramer G.R. Lynch J. Läuchli A. y Epstein E. 1987. Influx of Na^+ , K^+ and Ca^{2+} into roots of salt-stressed cotton seedlings. Effects of supplemental Ca. *Plant Physiol.* 83: 510-516.

Cramer G.R., Albercio G.J. y Schmidt C. 1994. Salt tolerance is not associated with the sodium accumulation of two maize hybrids. *Australian Journal of Plant Physiology*, 21: 675-692.

Croughan T.P. Stavarek S.J. and Rains D.W. 1978. Selection of a NaCl tolerant line of cultured alfalfa cells. *Crops Science*, 18: 959-963.

Danneberg G., Latus C., Zimmer W., Undesagen B., Schneider-Poetsch Hj. y Bothe H. 1992. Influence of vesicular- arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *J. Plant Physiol.* 141, 33-39.

Davies Jr., F.T., Potter J.R. y Linderman R.G. 1992. Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. *J. Plant Physiol*, 139: 289-294.

Deane-Drummond C.E. y Glass A.D. 1982. Studies of nitrate influx into barley roots by use of $^{36}\text{ClO}_3$ as a tracer for nitrate. I. Interactions with chloride and other ions. *Can. J. Bot*, 60: 2147-2153.

Debergh P. y Maeve N. A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. *Sci. Hort.* 14: 335-345.

Debergh P. 1986. Micropropagation of herbaceous plants. In: *Micropropagation in Horticulture. Practice and commercial problems*. Symposium Nottingham, Ed. P. Alderson, pp. 27-36.

Dix P.J. 1980. Environmental stress resistance. Selection in plant cell cultures. In: *Plant Cell Cultures: Results and Perspectives*. (F. Sala, B. Parisi, R. Cella and O. Ciferri, Eds.) pp. 183-186. Amsterdam, Elsevier/North Holland Press.

Dix P.J. y Street, H.E. 1975. Sodium chloride-resistant cultured cell lines from *Nicotiana sylvestris* spec. and comes and *Capsicum anuum*, L. *Plant Sci. Lett*, 5:231-237.

Dudal R. y Purnell M.F. 1986. Land resources: salt affected soils. *Reclamation and Revegetation Research*. 5: 1-9.

Dudeck A.E., Peacock C.H. y Sheehan T.J. 1986. An evaluation of germination media for turfgrass salinity studies. *Journal of the American Society for the Horticultural Science*, 177: 170-173.

Duke E.R., Johnson C.R. y Kock K.E. 1986. Accumulation of phosphorus, dry matter and betaine during NaCl stress of split root citrus. Seedlings colonized with vesicular arbuscular mycorrhizal fungi on zero, one and two leaves. *New Phytol.* 104: 583-590.

Epstein E. y Rains D.W. 1987 Advances in salt tolerance. *Plant and soil*. 99:17-29.

Esechie H.A. y Rodríguez V. 1998. Ion compartmentation in salinity-stressed alfalfa seedlings growing under different temperature regimes. *Commun soil sci plant anal*, 29 (17/18): 2607-2618.

Evans D.A., Flick C.E., Kut, S.A. y Reed, S.M. 1982. Comparison of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana nemophila* hybrids produced by culture and protoplast fusion. *Theor. Appl. Genet.* 62: 193-198.

Fagbola O. 1998. Growth of cassava cultivar TMS 30572 as affected by alley-cropping and mycorrhizal inoculation. *Biol fertil soils*. 27 (1): 9-14.

FAO. 2000. FAO-AGL-Global AEZ Crop Suitability Maps. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/cropsuit.asp>

Feigin A., Rylski I. Meiri A. y Shalhevet J. 1987. Response of melon and tomato plants to chloride-nitrate ratios in saline nutrient solutions. *J. Plant Nutr.* 10: 1787-1794.

Fereol L. 1978. Multiplication végétative et élimination de la mosaïque du Manioc par thermothérapie sur les plantes cultivées in vitro. In: *Diseases of tropical crops. Proceedings of an Intern. Symposium*, Louvain la Neuve, Belgium pp. 285-295.

Flowers T.J., Lachn D.R., Flowers S.A. y Yeo A.R. 1985. Some effects of sodium chloride on cells of rice cultured in vitro. *Plant Science*, 39: 205-221.

Franco J.A., Fernández J.A. y Banon S. 1997. Relationship between the effects of salinity on seedling leaf area and fruit yield of six muskmelon cultivars. *HortScience*. Alexandria, Va: The American Society for Horticultural Science, v 32, 4: 642-644.

Fregene M., Ospina J.A. y Roca W. 1998. Recovery of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants from culture of immature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ. Cult.* v 55, 1: 39-43.

Gale H., Kohl H.C. y Hagan R.H. 1967. Changes in the water balance and photosynthesis of onion bean and cotton plants under saline conditions. *Physiologia plantarum* 20: 408-420.

Gamborg O.L., Miller R.A. y Ohyama K. 1968. Nutrient requirements of suspensión cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50: 148-151.

Gangopadhyay G., Basu S. y Gupta S. 1997. In vitro selection and physiological characterization of NaCl- and mannitol-adapted callus lines in Brassica juncea. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* Dordrecht, The Netherlands : Kluwer Academic Publishers. 1997. 50: 161-169.

Gautheret, R.J. 1959. La culture des Tissus Végétaux, Masson Ed., Paris.

Gianinazzi S., Gianinazzi-Pearson V. y Trouvelot A. 1990. Potentialities and procedures for the use of endomycorrhizas with special emphasis on high value crops. In: J.M. Whipps y B. Lumsden (Editors), *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 41-54.

Gilmore A.E. 1971. The influence of endotrophic mycorrhizae on the growth of peach seedlings. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 96. 35-38.

Goldner R., Umiel, N. y Chen Y. 1977. The growth of carrot callus cultures at various concentrations and compositions of saline water. *Z. Pflanzenphysiol.* 85: 307-318.

Gorham J., Foster B.P., Budrewicz E., Wyn Jones R.G., Miller T.E. y Law, C.N. 1986. Salt tolerance in the Triticeae: solute accumulation and distribution in an

amphidiploid derived from *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring and *Thinopyrum bessarabicum*. *J. Exp. Bot.* 37, 1435-1449.

Grattan S.R. y Grieve C.M. 1992. Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 38: 275-300.

Greenway H. y Munns R. 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halophytes. *Annual Review Plant Physiology*, 31: 149-190.

Gribaudo I., Morte M.A. y Schubert A. 1995. Use of gentian violet to differentiate *in vitro* and *ex vitro*-formed roots during acclimatization of grapevine. *Plant Cell, tissue and Organ Culture*, 41: 187-188.

Grieve C.M. y Mass E.V. 1988. Diferential effects of sodio on sorghum genotypes. *Crop Sci.* 28: 659-665

Gu F., Xiaolin L., Fusuo Z. y Shengxiu LI. 1998. Effects of arbuscular mycorrhizal fungus on P nutrition and the growth of corn under NaCl stress conditions. 2nd *International Conference on Mycorrhiza Uppsala*, Sweden. 5-10 July.

Habte M. y Byappanahalli MN. 1994. Dependency of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) on Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Mycorrhiza*, v 4, 6: 241-245.

Hafizur-Rahman M., Krishnaraj S. y Thorpe T.A. 1995. Selection for salt tolerance *in vitro* using microspore-derived embryos of *Brassica napus* cv. topas, and the characterization of putative tolerant plants. *In-vitro-cell-dev-biol.-Plant*, v 31, 2: 116-121.

Harley J.L. y Smith S.E. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, London.

Hawker J.S. y Smith G.M. 1982. Salt tolerance and regulation of enzymes of starch syntesis in cassava (*Manihot esculenta* Cranz). *Aust. J. Plant Physiol*, 9: 509-518.

He T. y Cramer G.R. 1993. Growth and ion accumulation of two rapid-cicling Brassica species differing in salt tolerance. *Plant and Soil*, 153: 19-31.

Heller R. 1953. Recherches sur la nutrition minerale des tissus végétaux cultivés *in vitro*. *Ann. Nat. Bot. Biol. Vég.* 14:1-223.

Heloir M.C., Fournioux J.C., Oziol L. y Bessis R. (1997). An improved procedure for the propagation *in vitro* of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Pinot noir) using axillary-bud microcuttings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49: 223-225.

Hirrel M.C. y Gerdemann J.W. 1980. Improved growth of onion and bellpepper in saline soil by two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. *Soil Sci. Amer. J.* 44: 654-655.

Hooker J.E., Gianinazzi S., Vestberg M., Barea J.M. y Atkinson D. 1994. The application of arbuscular mycorrhizal fungi to micropropagation systems: an opportunity to reduce inputs. *Agric. Sci. Fin.* 3, 227-232.

Horgan. 1986. *Int. Congr. Plant Tissue Cell Culture Abstr.* 6, 295, 1986

Howeler R.H., Cadabid L.I. y Burckhardt E. 1982. Response of cassava to VA mycorrhizal inoculation and phosphorus application in greenhouse and field experiments. *Plant and Soil*, 69: 327-339.

Huetteman C.A. y Preece J.E. 1993. Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell Tissue and organ Culture*, 33: 105-119.

INVAM's. 2000. Clasification of glomales. http://invam.caf.wvu.edu/Myc_Info/Taxonomy/classification.htm

Indira P. y Ramanujam T. 1982. Note on potassium: sodium ratio in cassava grown under salt moisture stress. *Indian J. Agric. Sci.*, 52: 198-199.

Iyengar E.R.R., Patolia J.S. y Kurian T. 1977. Varietal differences in barley to salinity. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. 84: 355-361.

Jacobsen L. y Rosendahl L. 1990. Carbon flow into soil and external hyphae of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytol*, 115: 77-83.

Jana S. 1987. Strategies for breeding salt-tolerant wheat and barley. *International Symposium on improving winter cereals under temperature and salinity stresses*. Córdoba.

Janos D.P. 1980. Mycorrhizae influence tropical succession. *Biotrophica*. 12: 56:64.

Johnston M., Grof C.P.L. y Brownll P.F. 1984. Responses to ambient CO₂ concentration by sodium-deficient C₄ plants. *Aust. J. Plant Physiol*, 11: 137-141.

Joseph T., Yeoh H.H. y Loh C.S. 1999. Cyanogenesis in somatic embryos and plantlets of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *J. Sci. Food Agric*, v 79, 8: 1071-1074.

Kafkafi U. 1984 Plant nutrition under saline conditions: In : I Shainberg and J. Shalhevet (Edt). *Soil Salinity under irrigation- Processes and Management*. Springer. Berlin. pp. 319-338.

Kafkafi U., Valoras N. y Latey J. 1982. Chloride interaction with nitrate and phosphate nutrition in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *J. Plant Nutr*, 5: 1369-1385.

Kaiser W.J. y Teemba L.R. 1979. Use of tissue culture and thermotherapy to free east african cassava cultivar brown streak disease. *Plant diseases Rep*, v 63, 9:780-784.

- Kamalam P., Rajendran P.G. y Hrishi N.** 1977. A new technique for the rapid propagation of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). *Trop. Agric.* (Trinidad) 54: 213-217.
- Kartha K.K. y Gamborg O.L.** 1978. Meristem culture technique in production of disease free plant and freeze preservation of germplasm of tropical tuber crops and grain legum. In: *Disease of tropical crops*. Proc. Int. Sym., Louvain la Neuve, Belgique, pp. 267-283.
- Kartha K.K., Gamborg O.L., Constabel F. y Shyluk J.P.** 1974. Regeneration of cassava plants from apical meristems. *Plant Sci. Lett.*, 2:107-113.
- Kent L.M. y Läuchli A.** 1985. Germination and seedling growth of cotton: Salinity-calcium interactions. *Plant Cell and Environment*, 8: 155-159.
- Khan M.A., Ungar I.A. y Showalter A.M.** 1999. Effects of salinity on growth, ion content, and osmotic relations in *Halopyrum mucronatum* L. Stapf. *J-plant-nutr*, v 22, 1: 191-204.
- Khatun S. y Flowers T.J.** 1995. Effects of salinity on seed set in rice. *Plant, Cell and Environment*, 18: 61-67.
- Khrais T., Leclerc Y. y Donnelly D.J.** 1998. Relative salinity tolerance of potato cultivars assessed by in vitro screening. *Am J Potato Res*, v 75, 5: 207-210.
- Kirdmanee C., Cha-um S. y Wanussakul R.** 1998. Morphological and physiological comparisons of plantlets in vitro: responses to salinity. *Acta-hortic*, 457: 181-186.
- Klobus G., Ward M.R. y Huffaker R.C.** 1988. Characteristics of injury and recovery of net NO_3^- transport of barley seedlings from treatments of NaCl. *Plant Physiol*, 87: 878-882.
- Knop W.** 1884. Bereitung einer konzentrierten Nährstoffösung für Pflanzen. *Landw Versuchs-Stat*, 30:292-294.
- Koide R.** 1991. Nutrient supply, nutrient demand and plant response to mycorrhizal infection. *New Phytol*, 117: 365-386.
- Konan N.K. y Sangwan-Norreel B.S.** 1994. Efficient in vitro shoot regeneration systems in cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). *Plant Breed*, 113: 227-236.
- Konan N.K., Shopke C., Cárcamo R., Beachy R.N. y Fauquet C.** 1997. An efficient mass propagation system for cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) based on nodal explants and axillary bud-derived meristems. *Plant Cell Reports*, 16: 444-449.
- Kothari, S.K., Marschner H. y Römheld D.** 1991. Effect of a vesicular- arbuscular mycorrhizal fungus and rhizosphere micro-organisms on manganese reduction in the rhizosphere and manganese concentrations in maize (*Zea mays* L.) *New Phytol*. 117: 649-655.

- Kuo Y.J., Smith M.A.L. y Spomer L.A.** 1994. Merging callus level and whole plant micro-culture to select salt-tolerant 'Seaside' creeping bentgrass. *J-plant-nutr*, v 17, 4: 549-560.
- Lambert D.H. y Weidensaul T.C.** 1991. Element uptake by micorrhizal soybean from sewage-sludge-treated soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 55: 393-398.
- Larkin P.J. y Scowcroft W.R.** 1981. Somaclonal variation a novel new source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet*, 60: 197-214.
- Läuchli A. and Epstein E.** 1984. Mechanisms of salt tolerance in plants. *California Agriculture*, 36: 18-20.
- Li H.Q., Guo J.Y., Huang Y.W., Liang C.Y., Liu H.X., Potrykus I. y Puonti-Kaerlas J.** 1998. Regeneration of cassava plants via shoot organogenesis. *Plant Cell Rep*, v 17, 5: 410-414.
- Litz R.E. y Gray D.J.** 1992. Organogenesis and smatic embriogenesis. In: Biotechnology of Perennial Frits Crops. Ed. Hammerschlafl and Litz CAB. *Biotechnology in Agriculture*. Nº 8. Bristol. England.
- Liu M.C. y Chen W.H.** 1977. Organogenesis and chromosome number in callus derived from cassava anthers. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Liua P. y Baob W.** 1998. Cell types in the wild type callus of rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by screening for salt tolerant lines with selection pressure. *Plant Sci*, v 131, 2: 195-202.
- Lovato P.E., Gianinazzi-Pearson V., Trouvelot, A. y Gianinazzi S.** 1996. The state of art of mycorrhiza and micropropagation. *Adv Hotic. Sci.*, 10: 46-52.
- Lu C.Y.** 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In vitro Cell Dev Biol* 29: 92-96.
- Lynch J. y Läuchli A.** 1985. Salt stress disturbs the calcium nutrition of barley (*Hordeum vulgare* L). *New Phytol*, 99: 345-354.
- Ma G.** 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 1-7.
- Mabanza J. y Jonard R.** 1981. La multiplication des clones du Manioc (*Manihot esculenta* Crantz) à partir d'apex isolés in vitro. C.R. *Acad. Sci*, Série 3, 292: 839-842.
- Mabanza J. y Jonard R.** 1984. Sur l'isolement et le développement in vitro des protoplastes de *Manihot glaziovii* Muell. C.R. *Acad. Sci*. Paris, Série 3, 298 (19):563-566.
- Margara J.** 1988. Multiplicacióm vegetativa y cultivo "in vitro". Ed. Mundi-Prensa Madrid.

Marschner H. 1971. Why sodium replace potassium in plants? *Proc. 8th Colloq. Int. Potash Inst.* Bern, pp 50-63.

Marschner H. 1986. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London.

Marschner H. y Dell B. 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant Soil* 159: 89-102.

Marschner H. y Possingham J.V. 1975. Effect of K^+ and Na^+ on growth of leaf discs of sugar beet and spinach. *Z. Pflzenphysiol*, 75: 6-16.

Marschner H., Kylin A. y Kuiper P.J.C. 1981. Differences in salt tolerance of tree sugar beet genotypes. *Physiol. Plant*, 51, 234-238.

Marschner H., Römheld V., Horst W.J. y Martin P. 1986. Root-induced pH changes in the rhizosphere: importance for the mineral nutrition of plants. *Z. Pflanzenernähr. Bodnek.* 149: 441-456.

Martínez V. y Cerdá A. 1989. Influence of N source on rate of Cl, N, Na and K uptake by cucumber seedlings grown in saline conditions *J. Plant Nutr*, 12: 971-983.

Mass E.V. 1986. Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research*, 1: 12-26.

Mass E.V. y Grieve C.M. 1987. Sodium-induced calcium deficiency in salt-stressed corn. *Plant Cell Environ.* 10: 559-564.

Mass E.V. y Hoffman G.J. 1977. Crop salt tolerance: current assessment. *Journal of the Irrigation and Drainage Division*. ASCE. Vol 103. N°IR2. Proc. Paper 12993. 115-134.

Mathur N. y Vyas A. 1995. In vitro production of *Glomus deserticola* in association with *Ziziphus nummularia*. *Plant Cell Report*, pp. 735-737

Médard R. 1973. Morphogénèse du Mandioc, *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiacées, Crotonoïdées). Etude descriptive. *Adansonia*, serie 2, v 13, 4: 483-494.

Médard R. 1985. La morphogénèse foliaire du Manioc, *Manihot esculenta* Crantz (Euphorbiacées, Crotonoïdeae): Ontogénèse comparée de la forme normale et de formes variantes stables et approche microchirurgicale des étapes de la détermination foliaire. *Thèse Doct. D'Etat*, Univ. Louis Pasteur, Strasbourg.

Melchers G. 1972. Haploid higher plants for plant breeding. *Z. Pflanzenzüchtg*, 67: 19-32.

Miege J. 1957. Essais culturaux sur le manioc. *J. Agri. Trop. Bot. Appl.* 4 (9-10): 402-441.

Milford G.F.J., Colmarck W.F. y Durrant M.J. 1977. Effects of sodium chloride on water status and growth of sugar beet. *J. Exp. Bot.* 28: 1380-1388.

- Mok M.C., Mok D.W.S., Armstrong D.J. Shudo K., Isogai Y. y Okamoto T.** 1982. Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thydiazuron). *Phytochemistry*, 21: 1509-1511.
- Morabito D., Mills D., Prat D. y Dizengremel P.** 1994. Response of clones of *Eucalyptus microtheca* to NaCl in vitro. *Tree-physiol*, v 14, 2: 201-210.
- Morel G.M.** 1975. Meristem culture techniques for the longterm storage of cultivated plants. In: *Crop genetic resources for today and tomorrow* (O.H. Frakel and J.G. Hawkes, eds.). Cambridge Univ. Press., Cambridge. pp.327-332
- Morton J.B.** 1990. Evolutionary relationships among arbuscular mycorrhizas fungi in the Endogonaceae. *Mycologia*, 82: 192-207.
- Morton J.B. y Redecker D.** 2001. Two new families of Glomales, Archaeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera *Archaeospora* and *Paraglomus*, based on concordant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93: 181-195.
- Munns R.** 1993. Physiological processes limiting plant growth in saline soil: some dogmas and hypothesis. *Plant, Cell and Environment*, 16: 15-24.
- Munns R., Schachtman D.P. y Condon A.G.** 1995. The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Aust J Plant Physiol*. Melbourne, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. v 22, 4: 561-569
- Murashige T.** 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol*. 25: 135-166.
- Murashige T. y Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, 15: 473-497.
- Mussio I., Chaput M.H., Serraf I., Ducreux G. y Sihachakr D.** 1998. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of an African clone of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and analysis of the conformity of regenerated plants. *Plant Cell Tissue and organ Culture*, v. 53, 3: 205-211.
- Nabors M.V., Daniels A., Nadolny L. y Brown C.** 1975. Sodium chloride tolerant lines of tobacco cells. *Plant. Sci. Letters*, 4: 155-159.
- Nabors M.W., Gibs S.E., Bernstein C.S. y Mais M.E.** 1980. NaCl-tolerant tobacco plants from cultured cells. *Z. Pflanzenphysiol*, 97: 13-17.
- Nair N.G., Kartha K.K. y Gamborg O.L.** 1979. Effects of growth regulators on plant regeneration from shoot apical meristems of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and on the culture of internodes in vitro. *Z. Pflanzenphysiol*, v. 95, 5:51-56.
- Neumann P.** 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant, Cell and Environment*, 20: 1193-1198.

- Nicolson T. H.** 1975. Evolution of vesicular-arbuscular mycorrhizas. En: *Endomycorrhizas*, Sanders, F.E.; Mosse, B.; y Tinker P.B. (edts), Academy Press, London pp 25-34.
- Nieman R.M. y Shannon M.C.** 1977. Screening for salt tolerance . AID. *Joint Invitational Workshop on Adaptation of Plants to Mineral Stress in Problems Soils*. USDA ARS. Cornell University, pp. 2-23.
- Noerhadi E. y Widiyanto S.N.** 1982. Callus growth of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Proc. 5th Int. Cong. Plant Tissue Cell Cult. Plant Tissue Cult.* 1982.
- Nzoghe D.** 1989. Recherche de conditions permettant l'obtention de neoformations chez diferentes genotypes de manioc (*Manihot esculenta* Crantz). Extension a la culture de protoplastes. *Thèse doct.* Inst. Nat. Agr. Paris-Grignon.
- Ochatt S.J., Marconi P.L., Radice S., Arnozis P.A. y Caso O.H.** 1998/1999. In vitro recurrent selection of potato: production and characterization of salt tolerant cell lines and plants. *Plant-cell,-tissue-organ-cult*, v. 55, 1: 1-8.
- Ojala J.C., Jarrell W.M., Menge J.A. y Johnson W.L.** 1983. Influence of mycorrhizal fungi on the mineral nutrition and field of onion in saline soil. *Agronomy Journal*, 75: 255-259.
- Orton T.J.** 1980. Comparaison of salt tolerance between *Hordeum vulgare* L. and *H. jubatum* L. in whole plants and callus culture. *Z. Pflanzenphysiol*, 98: 105-118.
- Papadopoulos I. y Rendig V.V.** 1983. Tomato plant response to soil salinity. *Agronomy Journal*, 75: 696-700.
- Pardossi A., Malorgio F. y Tognoni F.** 1999. Salt tolerance and mineral relations for celery. *J Plant Nutr*, v. 22, 1: 151-161.
- Pasternak D.** 1987. Salt tolerance and crop production - a comprehensive approach. *Annual Review Phytopathology*, 25: 271-291.
- Pérez A.** 1997. Comparación entre diversos métodos de germinación en el olivo. *Trabajo Fin de Carrera Escuela Universitaria Ingenieros Técnicos Agrícolas "El Cuarto"* (Sevilla).
- Pérez-Alfocea F.** 1991. Efectos de la salinidad y mecanismos de tolerancia a nivel celular y a nivel de planta de tomate. *Tesis Doctoral*, Universidad de Murcia.
- Pfeiffer C.M. y Bloss H.E.** 1988. Growth and nutrition of Guayule (*Parthenicum argentatum* L.) in a saline soil as influenced by vesicular-arbuscular mycorrhizal and phosphorus fertilization. *New Phytol*, 108: 315-321.
- Pierik R.L.M.** 1990. Cultivo in vitro de las plantas superiores. Ed Mundi-Prensa. Madrid. 326 pp.

Pirozynski K.A. y Malloch D.W. 1975. The origin of land plants: A matter of mycotrophism. *Biosystems*, 6: 153-164.

Pond E.C., Menge J.A. y Jarrell W.M. 1984. Improve growth of tomato in salinized soil by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus collected from saline soil. *Mycologia*. 76: 74-84.

Ponnamperuma F.N. 1984. Role of cultivar tolerance in increasing rice production on saline lands. In: *Salinity tolerance in plants*. Staples R. C. Toenniessen G.H.(Edts.). John Wiley and Sons. New York, pp. 255-272.

Pons F., Gianinazzi- Pearson V., Gianinazzi S. y Navatel J.C. 1983. Studies of VA mycorrhizal synthesis of axenically propagated wild cherry (*Prunus avium* L.) plants. *Plant Soil*, 71: 217-221.

Poss J.A., Pond E., Menge J.A. y Harrell W.M. 1985. Effect of salinity on mycorrhizal onion and tomato in soil with and without additional phosphate. *Plant and Soil* 88: 307-319.

Protuguez A.J.P. y Mogilner I. 1967. Influencia de la intensidad lumínica en el crecimiento "in vitro" de ápices radiculares de mandioca. *Bonplandia*, v. 2, 6:107-112.

Raemakers C.J.M., Schavemaker C.M., Jacobsen, E. y Visser, RGF. 1993 Improvement of cyclic somatic embryogenesis of cassava (*Manihot esculenta*, Crantz). *Plant Cell Rep*, 12: 226-229.

Rathert G. 1982. Influence of extreme K: Na ratios and high substrate salinity on plant metabolism of crops differing in salt tolerance. *J. Plant. Nutr*, 5: 183-193.

Read D.J. 1991. Mycorrhizas in ecosystems. *Experientia*, 47: 376-390

Rhodes L.H. y Gerdemann J.W. 1975. Phosphate uptake zones of mycorrhizal and non mycorrhizal onions. *New Phytologist*, 75: 555-561.

Roca W.M. 1986. Cassava.. In: *Handbook of Plant Cell Culture*. Section V.Root and Tuber Crops, pp. 269-300.

Roca W.M., Rodríguez A., Patena L.F., Barba R.C. y Toro J.C.1980. Improvement of a propagation technique for cassava using single leaf-bud cuttings: a preliminary report. *Cassava News letter*, 8:4-5.

Rosendahl C.N. y Rosendahl S. 1991. Influence of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi (*Glomus spp*) on the response of cucumber (*Cucumis melo* L.) to salt stress. *Environmental and Experimental Botany*, v. 31, 3: 313-318.

Royo A. y Aragües R. 1989. Efectos de la salinidad sobre las plantas: tolerancia, manejo agronómico, genética y mejora. *Servicio de Investigación Agraria*. Diputación General de Aragón. pp. 65.

Royo A., Faci J. y Aragües R. 1987. Utilización de la triple línea de aspersión para evaluar la respuesta de los cultivos a la salinidad. *Smagua*, 1: 313-320.

Ruíz-Lozano J.M., Azcón R y Gómez M. 1995. Effects of arbuscular –mycorrhizal *Glomus* species on drought tolerance- physiological and nutritional plant responses. *Applied and environmental microbiology*, v. 61, 2: 456-460.

Ruíz-Lozano J.M., Azcón R. y Gómez M. 1996. Alleviation of salt stress by arbuscular-mycorrhizal *Glomus* species in *Lactuca sativa* plants. *Physiologia Plantarum*, 98: 767-772.

Ruíz-Lozano JM, Azcón R. 2000. Symbiotic efficiency and infectivity of an autochthonous arbuscular mycorrhizal *Glomus* sp. from saline soils and *Glomus deserticola* under salinity. *Mycorrhiza* 10: 137-143.

Scowcroft W.R. y Larkin P.J. 1982. Somaclonal variation: a new option for plant improvement. In: *Plant improvement and somatic cell genetics* (Vasil I.K. Scowcroft W.R. nd Fry K.J. ed.) Academic Press. New York.

Seibert M., Wetherbee P.J. y Job D.D. 1975. The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in Tobacco callus. *Plant Physiology*, 56: 130-139.

Serret M.D., Trillas M.I., Matas J. y Araus J.L. 1997. The effect of different closure types, light, and sucrose concentrations on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation ex vitro”. *Plant-cell,-tissue-organ-cult.* v. 47, 3: 217-230.

Shannon M.C. 1979. In quest of rapid screening techniques for plant salt tolerance. *HortScience*. 14: 587-589.

Shannon M.C. 1984. Breeding, selection and genetics of salt tolerance . En: *Salinity tolerance in Plants*. 231-254. Staples R.C. , Toenniessen (Edts.) John wiley & Son s . New York

Sharpley A.N., Meisinger J.J., Power J.F. y Suárez D.L. 1986. Root extraction of nutrients associated with long-term soil management. In B. Stewardt (ed.). *Advances in Soil Science*. Springer. New York.

Short D.C. y Colmer T.D. 1999. Salt tolerance in the halophyte *Halosarcia pergranulata* subsp. *pergranulata*. *Ann-bot*, v. 83, 3: 207-213.

Sieverding E y Galvez A. L. 1988. Performance of different cassava clones with various VA mycorrhizal fungi. *Angew. Bot.* V. 64, 5-6: 273-282.

Sieverding E. 1991. Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza management in tropical Agrosystems. *Deutsche Gesellschaft Technische Zusammenarbeit (GZT)*, Eschborn, Germany.

Silvestre P y Arrandean M. 1983. Le manioc. *Tech. Agr. Prod. Trop*, pp. 262.

Skene K.G.M. y Barlass M. 1998. Response to NaCl of Grapevine regenerated from Multiple Shoot Cultures Exhibing Mild Salt Tolerance In Vitro. *Am. J. Enol. Vitic*, v. 39, 2: 125-128.

Skoog F. y Miller C.O. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, 11:118-130.

Smith M.K. y McComb J.A. 1981 a. Effect of NaCl on the growth of whole plants an their corresponding callus cultures. *Aust. J. Plant Physiol*, 8, 267-275.

Smith M.K. y McComb J.A. 1981 b. Use of callus culture to detect NaCl tolerance in cultivars of tree species of pasture legumes. *Aust. J. Plant Physiol*, 8, 437-442.

Smith S.E. 1980. Mycorrhizas of autotrophic higer plants. *Biol. Rev*, 55: 475-510.

Smith S.E., St. John B.J., Smith F.A. y Nicholas D.J.D. 1985. Activity of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in *Tryfolium subterraneum* and *Allium cepa* L: effects of micorrhizal infection and phosphate nutrition. *New Phytol*, 99: 211-227.

Sofiari E., Raemakers C.J.M., Bergervoet J.E., Jacobsen E. y Visser R.G.F. 1998. Plant regeneration from protoplasts isolated from friable embryogenic cellus of cassava. *Plant Cell Reports*, 18: 159-165.

Sofiari E., Raemakers C.J.M., Kanju E., Danso K., van Lammeren A.M., Jacobsen E. y Visser R.G.F. 1997. Comparison of NAA and 2,4-D induced somatic embryogenesis in Cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50: 45-56.

Somal T.L.C. y Yapa P.A.J. 1998. Accumulation of proline in cowpea under nutrient, drought, and saline stresses. *J-plant-nutr*, v. 21, 11: 2465-2473.

Stamp J.A. y Henshaw G.G. 1982. Somatic embryogenesis in cassava. *Z. Pflanzenphysiol*, 105:97-102.

Stamp J.A. y Henshaw G.G. 1986. Adventitious regeneration in cassava. In: *Plant Tissue, Culture and its Agricultural Applications*. Lydsae A. Withers Ed. P.G. Alderson, pp. 149-156.

Stamp J.A. y Henshaw G.G. 1987. Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 10: 227-233.

Street H.E. y Öpik H. 1984. The Physiology of Flowering Plants: their growth and development. Edward Arnold Ed. Maryland (US). ISBN 0-7131-2883-6, pp. 279.

Strogonov B.P. 1973. Physiological basis of salt tolerance of plants. Jerusalem: Trad. Poljakoff-Mayber, A. y Mayer, A.M. *Israel Program Sci. Transl*, pp 1-279.

Stubblefield S.P. Taylor T.N. y Trappe J.M. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizae from the triassic of antarctica. *Amer J. Bot*, 74: 1904-1911.

- Sumaryati S., Negrutiu I. y Jacobs M.** 1992. Characterization and regeneration of salt- and water-stress mutants from protoplast culture of *Nicotiana plumbaginifolia* (Viviani). *Theor. Appl. Genet.* v. 83, 5: 613-619.
- Sutter E.G. y Langhans R.W.** 1979. Epicuticular wax formation carnation plantlets regeneration from shoot tip culture. *J. Amer. Soc. Hort. Sc.*, 104: 493-496.
- Tal M.** 1994. In vitro selection for salt tolerance in crop plants: theoretical and practical considerations. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 30: 175-180.
- Tal M.** 1985. Genetics of salt tolerance in higher plants: theoretical and practical considerations. *Plant Soil*, 89: 199-226.
- Tal M., Heikin H. y Dehan K.** 1978. Salt tolerance in the wild relatives of the cultivated tomato: responses of callus tissues of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum pennellii* to high salinity. *Z. Pflanzenphysiol*, 86: 231-240.
- Tanji K.K.** 1990. Agricultural Salinity Assessment and Manegement. Irrigation And Drainage Division. American Society of Civil Engineers. NY. USA.
- Taylor J.L.S. y Van-Staden J.** 1998. Plant-derived smoke solutions stimulate the growth of *Lycopersicon esculentum* roots in vitro. *Plant Growth Regul.* Dordrecht : Kluwer Academic Publishers. Nov 1998. v. 26, 2: 77-83.
- Termaat A., Passioura J.B., Munns R.** 1985. Shoot turgor does not limit growth of NaCl affected weat and barley. *Plant Physiology*, 77: 869-872.
- Tilquin J.P.** 1979. Plant regeneration from stem callus of cassava. *Can. J. Bot.*, 57:1761-1763.
- Timmer L.W. y Leyden R.F.** 1978. Stunting of citrus seedlings in fumigated soils in Texas and its correction by phosphorus fertilization and inoculation with mycorrhizal fungi. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 103: 533-537.
- Tinker P.B.** 1980. Role of rhizosphere micro-organisms in phosphorus uptake by plants. In *the Role of Phosphorus in Agriculture*. Eds S.E. Kwasahneh, E.C. Sample and E.J.Kamprath. American Society of Agronomy. Madison. pp 617-654.
- Tinker, P. B. H.** 1978. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on plant nutrition and plant growth. *Physiologie Végétale*, 16: 743-751.
- Troncoso A., Liñán J., Carretero C.L., Troncoso J. y García M^a. y Cantos M.** 2001. Influencia de la micorriza *Glomus fasciculatum* sobre el desarrollo en la fase de aclimatación de plántulas de olivo obtenidas in vitro. *IV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Cultivo in vitro de Tejidos Vegetales*. Santiago de Compostela, 17-20 Octubre.
- Troncoso A., Liñán J., Troncoso J., Rapoport H. y Cantos, M.** 1999 b. In vitro obtaining of salt tolerant olive plants. *International Meeting on Scientific Innovations*

and their applications to Oliviculture. International Olive Council (COI) and Accademia dei Georgofili. Florence. Italy.

Troncoso A., Matte C., Cantos M. y Lavee S. 1999 a. Evaluation of salt tolerance *in vitro*-grown grapevine rootstock varieties. *Vitis*, v. 38, 2: 55-60.

Van Genuchten M.T. 1983. Analizing crop salt tolerance data: model description and user's manual. USDA. *Agricultural Research Service US. Salinity Laboratory Research Report n°120*: 50 p.

Van Nieuwkerk J.P., Zimmerman R.H. y Fordham I. 1986. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *HortScience*, 21: 516-518.

Vavilov N.I. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Chronica Botanica*, 13: 364

Visser C., Quereshi J.A., Gill R. y Saxena P.K. 1992 Morphoregulatory role of thidiazuron: substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *Plant Physiol*, 99: 1704-1707.

Von Hendenström H. y Breckle S.W. 1974. Obligate halophytes?. A test with tissue culture methods. *Z. Pflanzenphysiol*, 74: 183-185.

Ward M.R., Aslam M. y Huffaker R.C. 1986. Enhancement of nitrate uptake and growth of barley seedlings by calcium under saline conditions. *Plant Physiol*, 80: 520-524.

Warren R.S. y Gould A.R. 1982. Salt tolerance expressed as a cellular trait in suspension cultures developed from the halophytic grass *Distichlis spicata*. *Z. Pflanzenphysiol*, 107: 347-356.

Warren R.S., Baird L.M. y Thompson A.K. 1985. Salt tolerance in cultures cells of *Spartina pectinata*. *Plant cell Rep*, 4, 84-87.

West D.W. 1978. Water use and sodium chloride uptake by apple trees. II. The response to soil oxygen deficiency. *Plant and Soil*. 50: 51-56.

West D.W. y Taylor J.A. 1984. Response of six grape cultivars to the combined effects of high salinity and rootzone waterlogging. *J. Am. Soc. Hort. Sci*, 109: 844-851.

White P.R. 1943. A handbook of tissue culture. The Jacques Castell Press, Lancaster, Pennsylvania.

White P.R. 1963. The cultivation of animal and plant cells. Ronald Press Co. New York (2nd. Edition).

Yahya A. 1998. Salinity effects on growth and on uptake and distribution of sodium and some essential mineral nutrients in sesame. *J-plant-nutr*, v. 21, 7: 1439-1451.

Yusnita S., Geneve R.L. y Kester S.T. 1990. Micropropagation of white flowering eastern redbud (*Cercis canadiensis* var "alba") L. *J. Environ Hortic.* 8: 177-179.

Zacchini M. y Morini S. 1998. Stomatal functioning in relation to leaf age in-vitro-grown plum shoots. *Plant Cell Reports*, 18: 292-296.

Zaid A. y Hughes H. 1995. A comparison of stomatal function and frequency of in vitro , in vitro polyethylene glycol treated, and greenhouse-grown plants of date palm, *Phoenix dactylifera* L. *Trop-agric.* St. Augustine, Trinidad : The University of the West Indies Press. v. 72, 2: 130-134.

Zenk, M.H. 1974. Haploids in physiological and biochemical research. In: Haploids in Higher Plants: Advances and Potential (K.J. Kasha, ed.) pp. 339-354: Univ. Guelph Press. Guelph.

Zhang Y. y Donnelly D.J. 1997. In vitro bioassays for salinity tolerance screening of potato. *Potato-res.* v. 40, 3: 285-295.

Ziv M., Schawart A. y Fleminger D. 1987. Hardening aspects of micropropagated carnation plants having malfunctioning stomata. Symposium Florizel 87. Arlon-Belgium.

Zok , S. 1992. Rapid seedstock multiplication of improved clones of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) though shoot tip culture on Cameroon. In Proceedings of the First International Scientific Meeting of the Casava Biotechnology Network, Cartagena, Colombia, 25-28 August 1992. Eds. W.M. Roca and A.M. Thro. pp 96-104. CIAT, Cali, Colombia.